

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393469 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.04

(51) Int. Cl. A61P 35/04 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.08.12

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ БЕЗ ИНВАЗИИ В МЫШЕЧНЫЙ СЛОЙ (NMIBC) С ПОМОЩЬЮ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛА С ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ (ADC), КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С БЕЛКАМИ 191P4D12

(31) 63/233,048; 63/242,380; 63/328,441

(72) Изобретатель:

(32) 2021.08.13; 2021.09.09; 2022.04.07

Каросино Кристофер, Нараянан
Суята, Гарг Амит (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/074897

(74) Представитель:

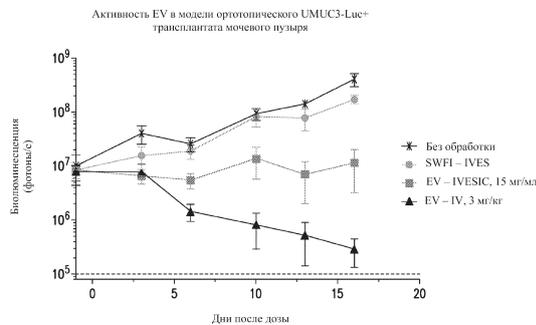
(87) WO 2023/019236 2023.02.16

Абильманова К.С. (KZ)

(71) Заявитель:

ЭДЖЕНСИС, ИНК.; СИДЖЕН ИНК.
(US)

(57) В данном документе представлены способы внутрипузырного лечения рака мочевого пузыря и способы лечения рака мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой с помощью конъюгатов антитела с лекарственным средством (ADC), которые связываются с белком 191P4D12 (нектином-4).



202393469

A1

A1

202393469

**СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ БЕЗ ИНВАЗИИ В
МЫШЕЧНЫЙ СЛОЙ (NMIBC) С ПОМОЩЬЮ КОНЬЮГАТОВ
АНТИТЕЛА С ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ (ADC), КОТОРЫЕ
СВЯЗЫВАЮТСЯ С БЕЛКАМИ 191P4D12**

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество по заявке США № 63/233048, поданной 13 августа 2021 года, заявке США № 63/242380, поданной 9 сентября 2021 года, и заявке США № 63/328441, поданной 7 апреля 2022 года, раскрытие каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

[0002] В настоящей заявке содержится машиночитаемый перечень последовательностей, который был представлен в формате файла XML вместе с настоящей заявкой, все содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Файл перечня последовательностей в формате XML, представленный с настоящей заявкой, имеет название "14369-281-228_SEQ_LISTING.xml", был создан 2 августа 2022 года и имеет размер 34743 байта.

1. Область техники

[0003] В данном документе представлены способы лечения рака мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC) с помощью конъюгатов антитела с лекарственным средством (ADC), которые связываются с белком 191P4D12 (нектином-4).

2. Предшествующий уровень техники

[0004] По оценкам, рак мочевого пузыря, наиболее распространенная форма уротелиального рака (UC) и шестой по распространенности рак в Соединенных Штатах (США), ежегодно уносит жизни почти 200000 пациентов во всем мире, в том числе более 65000 в Европе и почти 18000 в США (Bray 2018; Ferlay 2018; Siegel 2019). По оценкам, в 2018 году во всем мире за год было диагностировано более 549000 новых случаев рака мочевого пузыря. По оценкам, в 2020 году в США должно было быть 81400 новых случаев рака мочевого пузыря; данная оценка увеличилась до более 83000 случаев в 2021 году (Американское онкологическое общество (ACS), 2021 год; Национальный институт онкологии (NCI), 2021 год). Заболеваемость раком мочевого пузыря и смертность от него сильно возрастают с возрастом и будут становиться все более серьезной проблемой по мере старения населения.

[0005] Примерно от 70% до 80% диагнозов рака мочевого пузыря представляют собой заболевание без инвазии в мышечный слой (Chang 2016; Woldu 2017; Kates 2020; Li 2020). Рак мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC) представляет собой гетерогенную группу раковых заболеваний, в которую включены раковые заболевания, которые являются папиллярными по своей природе и ограничены слизистой оболочкой (Ta), характеризуются высокой степенью тяжести, а также являются плоскоклеточными и ограничены эпителием (Tis или карцинома in situ [CIS]) и инвазивными в подслизистую оболочку или собственную пластинку (T1) (Pasin 2008). Среди пациентов с NMIBC папиллярное заболевание является наиболее распространенным, поражая примерно 70% пациентов, тогда как такое заболевание, как T1, и CIS поражают примерно 20% и 10% пациентов соответственно (Kirkali 2005; Anastasiadis 2012).

[0006] Стандарт лечения NMIBC предусматривает хирургическую резекцию опухоли мочевого пузыря посредством трансуретральной резекции опухоли мочевого пузыря (TURBT) с последующим внутривезикулярным введением

терапевтических средств для дополнительного противоопухолевого действия (Kawai 2013; Chang 2016; Woldu 2017; Jamil 2019; Kates 2020). Внутрипузырная бацилла Кальмета-Герена (BCG) считается предпочтительным терапевтическим средством, которое запускает местные иммунные ответы, которые, судя по всему, коррелируют с противоопухолевым действием у пациентов с NMIBC, и особенно у пациентов с наличием характеристик высокого риска развития заболевания (Kassouf 2015; Chang 2016).

[0007] Заболевание, не отвечающее на BCG, означает подгруппу пациентов с NMIBC, которые не дали ответ на надлежащее лечение посредством BCG и остаются в группе высокого риска рецидива и прогрессирования заболевания до последующих стадий UC. Для данных пациентов дополнительное лечение посредством BCG не является вариантом, и наилучшим доступным вариантом остается радикальная цистэктомия. Некоторая эффективность была продемонстрирована для внутрипузырных химиотерапевтических средств, таких как гемцитабин, митомицин и валрубицин, однако в текущих руководствах утверждается, что такие средства лечения, отличные от радикальной цистэктомии, хуже подходят для лечения не дающего ответ на BCG заболевания (Navai 2016; Taylor 2020) (EAU. Guidelines for Non-muscleinvasive Bladder Cancer. 2020. <https://uroweb.org/guideline/non-muscle-invasive-bladdercancer/> Accessed от 16 февраля 2021 года). И хотя системный пембролизумаб недавно был одобрен для лечения пациентов с не дающим ответ на BCG заболеванием с карциномой *in situ* (CIS), более половины пациентов, получающих лечение пембролизумабом, не достигают полного ответа на терапию; следовательно, у данного контингента пациентов сохраняется потребность в безопасной и эффективной внутрипузырной терапии.

[0008] 191P4D12 (который также известен как нектин-4) представляет собой трансмембранный белок I типа с массой 66 кДа, который принадлежит к семейству нектиновых адгезивных молекул. Он состоит из внеклеточного домена (ECD), содержащего 3 иммуноглобулиноподобных (Ig-подобных) субдомена, трансмембранную спираль и внутриклеточный участок (Takai *et al.*,

Annu Rev Cell Dev Biol (2008); 24: 309-42). Считается, что нектин-4 опосредует Ca^{2+} -независимую межклеточную адгезию посредством как гомофильных, так и гетерофильных транс-взаимодействий в адгезионных контактах, где они могут рекрутировать кадгерин-1 и модулировать перестройки цитоскелета (Rikitake *et al.*, *Cell Mol Life Sci* (2008); 65(2): 253-63.). Идентичность последовательностей нектин-4 с другими представителями семейства нектин-4 низкая и варьирует в диапазоне 25-30% в ECD (Reymond *et al.*, *Biol Chem* (2001); 276(46): 43205-15).

[0009] Было обнаружено, что нектин-4 экспрессируется при множественных формах рака, особенно при уротелиальном раке, раке молочной железы, легкого, поджелудочной железы и яичника. Более высокие уровни экспрессии ассоциированы с прогрессированием заболевания и/или плохим прогнозом (Fabre-Lafay *et al.*, *BMC Cancer* (2007); 7: 73).

[0010] Остается неудовлетворенной потребность в безопасных и эффективных внутрипузырных средствах лечения для пациентов с NMIBC, не дающим ответ на BCG, которые непригодны для радикальной цистэктомии или она для них недопустима, или для пациентов, которые приняли осознанное решение не подвергаться радикальной цистэктомии.

3. Краткое описание изобретения

[0011] В данном документе представлены способы лечения рака мочевого пузыря у субъектов-людей посредством внутрипузырного введения конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), которое связывает 191P4D12.

[0012] Вариант осуществления 1. Способ лечения рака мочевого пузыря у субъекта-человека, предусматривающий внутрипузырное введение субъекту эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), где ADC содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12 и конъюгированы с одним или несколькими звеньями монометилауристатина E (MMAE).

[0013] Вариант осуществления 2. Способ по варианту осуществления 1, где рак мочевого пузыря представляет собой рак мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC).

[0014] Вариант осуществления 3. Способ по варианту осуществления 2, где NMIBC был подтвержден гистологическим методом и представляет собой карциному in situ (CIS).

[0015] Вариант осуществления 4. Способ по варианту осуществления 3, где у субъекта имеется папиллярное заболевание.

[0016] Вариант осуществления 5. Способ по варианту осуществления 3, где у субъекта нет папиллярного заболевания.

[0017] Вариант осуществления 6. Способ по любому из вариантов осуществления 2-5, где NMIBC был подтвержден гистологическим методом и где преобладающим гистологическим компонентом (>50%) является уротелиальная (переходно-клеточная) карцинома.

[0018] Вариант осуществления 7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где у субъекта имеется высокий риск развития заболевания, не дающего ответ на бациллу Кальмета-Герена (BCG).

[0019] Вариант осуществления 8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, где для субъекта недопустима радикальная цистэктомия или он отказывается от нее.

[0020] Вариант осуществления 9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где все видимые папиллярные опухоли Ta/T1 у субъекта были полностью удалены посредством резекции в пределах 60 дней до лечения.

[0021] Вариант осуществления 10. Способ по варианту осуществления 9, где у субъекта имеется остаточная истинная CIS.

[0022] Вариант осуществления 11. Способ по варианту осуществления 9, где у субъекта нет остаточной истинной CIS.

[0023] Вариант осуществления 12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, где субъект имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 0.

[0024] Вариант осуществления 13. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, где субъект имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 1.

[0025] Вариант осуществления 14. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, где субъект имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 2.

[0026] Вариант осуществления 15. Способ по варианту осуществления 14, где скорость клубочковой фильтрации (GFR) у субъекта составляет не менее 50 мл/мин и у субъекта нет сердечной недостаточности III класса по системе Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).

[0027] Вариант осуществления 16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-15, где у субъекта имеется одно или несколько патологических состояний, выбранных из группы, состоящей из следующих:

- a. абсолютное количество нейтрофилов (ANC) ≥ 1500 /мкл;
- b. гемоглобин (Hgb) ≥ 10 г/дл;
- c. количество тромбоцитов ≥ 100000 /мкл;
- d. сывороточный билирубин $\leq 1,5 \times$ верхнего предела нормы (ULN) или $\leq 3 \times$ ULN для субъектов с болезнью Жильбера;

e. расчетный клиренс креатинина (CrCl) ≥ 30 мл/мин (вместо креатинина или CrCl также можно использовать GFR); CrCl следует рассчитывать с помощью способа Кокрофта-Голта или уравнений модификации диеты при заболеваниях почек (MDRD); субъекты с функциональным статусом по ECOG, равным 2, должны иметь GFR ≥ 50 мл/мин;

f. аланинаминотрансфераза (ALT) и аспартатаминотрансфераза (AST) $\leq 3 \times$ ULN; или

g. международный нормализационный индекс (INR) или протромбиновое время (PT), активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT) или частичное тромбопластиновое время (PTT) $\leq 1,5$ ULN, если только субъект не получает антикоагулянтную терапию, при условии, что PT или aPTT находится в пределах терапевтического диапазона предусмотренного применения антикоагулянтов.

[0028] Вариант осуществления 17. Способ по варианту осуществления 16, где у субъекта имеются все патологические состояния (a)-(g) по варианту осуществления 16.

[0029] Вариант осуществления 18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17, где расчетная продолжительность жизни субъекта составляет более 2 лет.

[0030] Вариант осуществления 19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарности участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23.

[0031] Вариант осуществления 20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:9, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10, CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11, CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:13, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:14, или

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:16, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:17, CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:18, CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:19, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:21.

[0032] Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:9, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:10, CDR-H3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:11, CDR-L1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:12, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:13, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:14, или

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:16, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:17, CDR-H3,

состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:18, CDR-L1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:19, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:21.

[0033] Вариант осуществления 22. Способ по любому из вариантов осуществления 1-21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:22, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:23.

[0034] Вариант осуществления 23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8.

[0035] Вариант осуществления 24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')₂, Fv или scFv.

[0036] Вариант осуществления 25. Способ по любому из вариантов осуществления 1-24, где антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

[0037] Вариант осуществления 26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, где антитело представляет собой IgG1, а легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь.

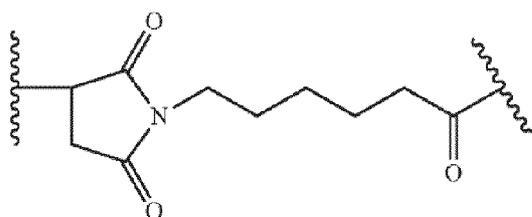
[0038] Вариант осуществления 27. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получены рекомбинантным методом.

[0039] Вариант осуществления 28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с каждым звеном MMAE посредством линкера.

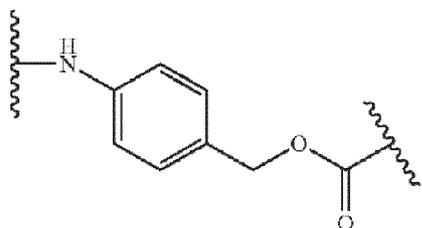
[0040] Вариант осуществления 29. Способ по варианту осуществления 28, где линкер представляет собой расщепляемый ферментом линкер, и где линкер образует связь с атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0041] Вариант осуществления 30. Способ по варианту осуществления 28 или 29, где линкер характеризуется следующей формулой: $-A_a-W_w-Y_y-$; где $-A-$ обозначает растягивающееся звено, a равно 0 или 1; $-W-$ обозначает аминокислотное звено, w обозначает целое число от 0 до 12; и $-Y-$ обозначает спейсерное звено, y равно 0, 1 или 2.

[0042] Вариант осуществления 31. Способ по варианту осуществления 30, где растягивающееся звено характеризуется структурой с представленной ниже формулой (1), аминокислотное звено представляет собой валин-цитруллин, а спейсерное звено представляет собой группу PAB, содержащую структуру с представленной ниже формулой (2):



Формула (1),



Формула (2).

[0043] Вариант осуществления 32. Способ по варианту осуществления 30 или 31, где растягивающееся звено образует связь с атомом серы антитела или

его антигенсвязывающего фрагмента, и где спейсерное звено связано с MMAE посредством карбаматной группы.

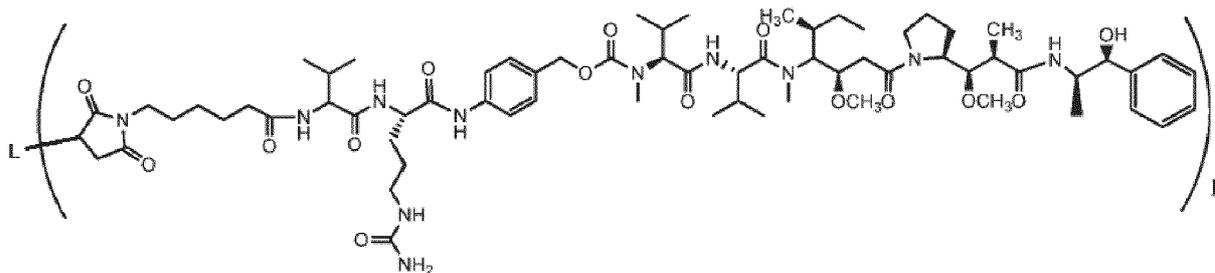
[0044] Вариант осуществления 33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где ADC содержит от 1 до 20 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0045] Вариант осуществления 34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-33, где ADC содержит от 1 до 10 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0046] Вариант осуществления 35. Способ по любому из вариантов осуществления 1-34, где ADC содержит от 2 до 8 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0047] Вариант осуществления 36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где ADC содержит от 3 до 5 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0048] Вариант осуществления 37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-36, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от 1 до 10.

[0049] Вариант осуществления 38. Способ по варианту осуществления 37, где p равно от 2 до 8.

[0050] Вариант осуществления 39. Способ по варианту осуществления 37 или 38, где r равно от 3 до 5.

[0051] Вариант осуществления 40. Способ по любому из вариантов осуществления 37-39, где r равно от 3 до 4.

[0052] Вариант осуществления 41. Способ по любому из вариантов осуществления 37-40, где r равно приблизительно 4.

[0053] Вариант осуществления 42. Способ по любому из вариантов осуществления 37-40, где среднее значение r эффективного количества конъюгатов антитела с лекарственным средством равно приблизительно 3,8.

[0054] Вариант осуществления 43. Способ по любому из вариантов осуществления 1-42, где ADC составлен в фармацевтическую композицию, содержащую L-гистидин, полисорбат-20 (твин-20) и дегидрат трегалозы.

[0055] Вариант осуществления 44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где ADC составлен в фармацевтическую композицию, содержащую приблизительно 20 мМ L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твина-20, приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы и гидрохлорид, и где pH фармацевтической композиции составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[0056] Вариант осуществления 45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где ADC составлен в фармацевтическую композицию, содержащую приблизительно 9 мМ гистидина, приблизительно 11 мМ моногидрата гидрохлорида гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твина-20, приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы, и где pH фармацевтической композиции составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[0057] Вариант осуществления 46. Способ по любому из вариантов осуществления 1-45, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую от приблизительно 100 мг до приблизительно 1000 мг, от

приблизительно 125 мг до приблизительно 950 мг, от приблизительно 125 мг до приблизительно 900 мг, от приблизительно 125 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 125 мг до приблизительно 800 мг или от приблизительно 125 мг до приблизительно 750 мг, с объемом инстилляций, составляющим от приблизительно 10 мл до приблизительно 100 мл.

[0058] Вариант осуществления 47. Способ по любому из вариантов осуществления 1-46, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую от приблизительно 125 мг до приблизительно 750 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл.

[0059] Вариант осуществления 48. Способ по любому из вариантов осуществления 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 125 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл.

[0060] Вариант осуществления 49. Способ по любому из вариантов осуществления 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 250 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл.

[0061] Вариант осуществления 50. Способ по любому из вариантов осуществления 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 500 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл.

[0062] Вариант осуществления 51. Способ по любому из вариантов осуществления 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 750 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл.

[0063] Вариант осуществления 52. Способ по любому из вариантов осуществления 1-51, где максимальное время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 90 минут.

[0064] Вариант осуществления 53. Способ по любому из вариантов осуществления 1-51, где максимальное время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 120 минут.

[0065] Вариант осуществления 54. Способ по любому из вариантов осуществления 1-51, где время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 120 минут.

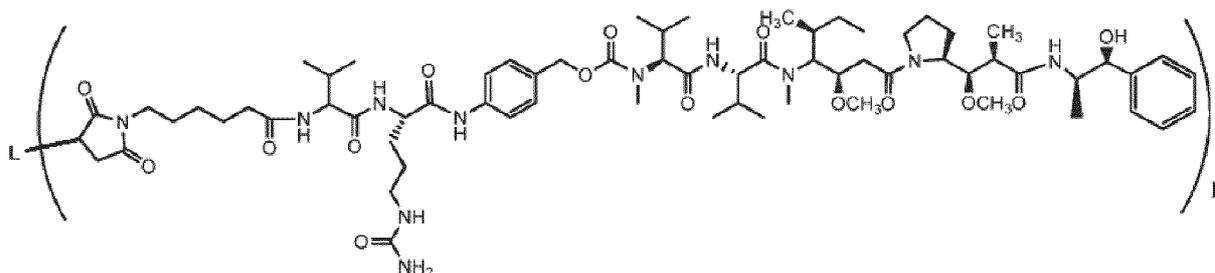
[0066] Вариант осуществления 55. Способ по любому из вариантов осуществления 1-54, где ADC вводят внутрипузырно в течение двух фаз, где две фазы представляют собой фазу индукции и фазу поддержания дозы.

[0067] Вариант осуществления 56. Способ по варианту осуществления 55, где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель, в диапазоне от шести до девяти недель или в диапазоне от шести до восьми недель после фазы индукции.

[0068] Вариант осуществления 57. Способ по варианту осуществления 55 или 56, где ADC вводят внутрипузырно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции.

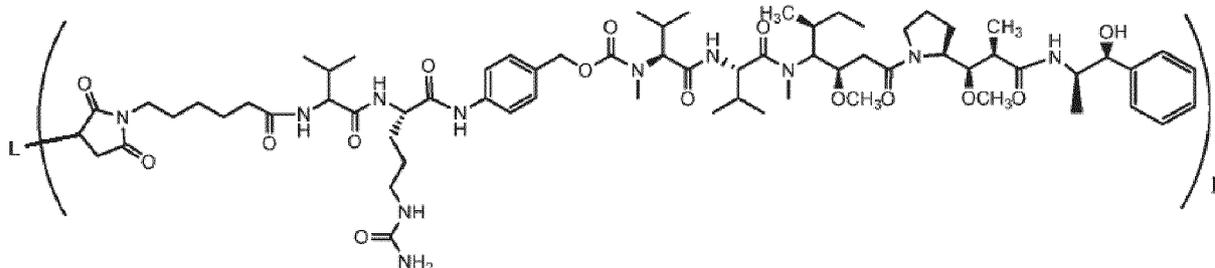
[0069] Вариант осуществления 58. Способ по любому из вариантов осуществления 55-57, где ADC вводят внутрипузырно один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы.

[0070] Вариант осуществления 59. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 125 мг, с объемом инстилляции, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

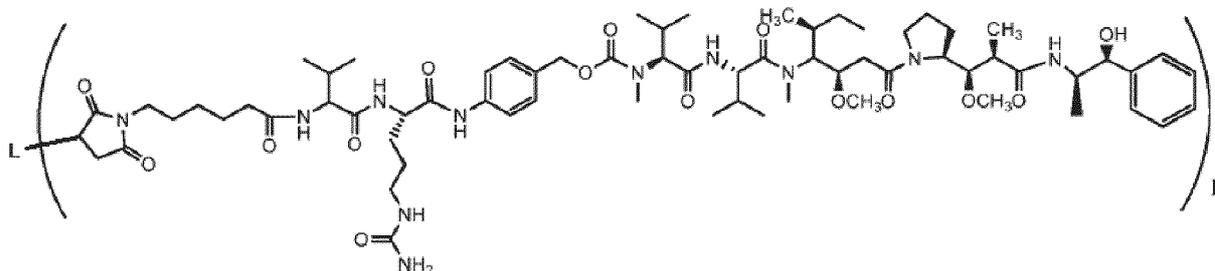
[0071] Вариант осуществления 60. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей

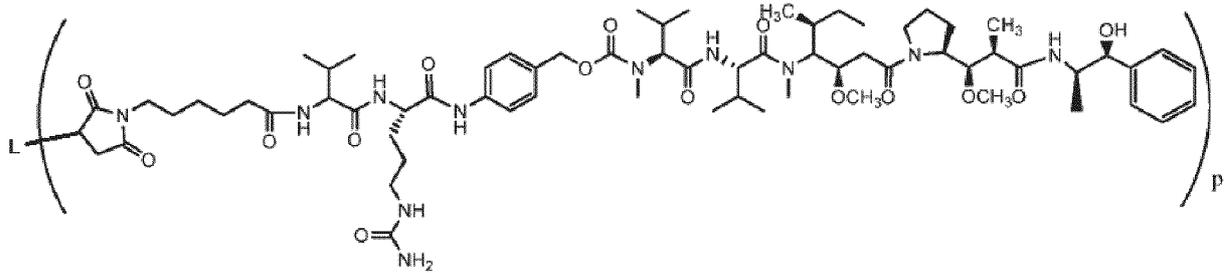
приблизительно 250 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

[0072] Вариант осуществления 61. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 500 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

[0073] Вариант осуществления 62. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутрипузырно в дозе, составляющей приблизительно 750 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутрипузырно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

4. Краткое описание графических материалов

[0074] На ФИГ. 1А-1Е изображены нуклеотидные и аминокислотные последовательности белка нектина-4 (ФИГ. 1А), нуклеотидные и аминокислотные последовательности тяжелой цепи (ФИГ. 1В) и легкой цепи (ФИГ. 1С) из Na22-2(2.4)6.1, а также аминокислотные последовательности тяжелой цепи (ФИГ. 1D) и легкой цепи (ФИГ. 1Е) из Na22-2(2.4)6.1

[0075] На ФИГ. 2 изображена цитотоксическая активность энфортумаба видотина (EV) *in vitro* в клетках карциномы мочевого пузыря, сверхэкспрессирующих нектин-4 (т. е. UM-UC-3-hNectin-4⁺), при использовании условий, которые имитируют внутрипузырное введение.

[0076] На ФИГ. 3А-3Е изображена эффективность внутрипузырного введения энфортумаба видотина (EV) на мышинной модели ортотопического ксенотрансплантата нектин-4⁺ мочевого пузыря. На ФИГ. 3А изображено получение мышей SCID с ортотопическим имплантом после химической абразии UM-UC-3-hNectin4⁺-Luc⁺ клетками, а также схема введения доз для введения внутрипузырного EV мышам с последующим гистологическим анализом ткани мочевого пузыря. На ФИГ. 3В изображены результаты биоломинесцентной визуализации, подтверждающие приживление трансплантата опухоли и активность EV. SWFI: стерильная вода для инъекции. На ФИГ. 3С изображены результаты иммуногистохимического анализа антитела к нектину-4, которые подтверждают активность EV. Ткань мочевого пузыря на пяти правых секциях на ФИГ. 3С получена от пяти мышей, которых обрабатывали посредством внутрипузырных доз EV на ФИГ. 3В соответственно. На ФИГ. 3D изображены результаты количественного анализа результатов биоломинесцентной визуализации, представленных на ФИГ. 3В. На ФИГ. 3Е изображены результаты иммуногистохимического (IHC) окрашивания нектина-4 и ММАЕ в ткани опухоли мочевого пузыря, на которых видна совместная локализация нектина-4 и ММАЕ.

[0077] На ФИГ. 4А-4В изображены свободные ММАЕ в ткани мочевого пузыря крыс линии Спрег-Доули (Sprague-Dawley), которых обрабатывали посредством однократной внутрипузырной дозы EV в различных концентрациях и объемах введения.

[0078] На ФИГ. 5 изображено содержание в системном кровотоке внутрипузырного EV.

[0079] На ФИГ. 6 изображены свободные ММАЕ в ткани мочевого пузыря крыс Спрег-Доули, которых обрабатывали посредством однократной внутрипузырной дозы EV, для различной продолжительности времени пребывания в организме.

[0080] На ФИГ. 7 изображена схема клинического испытания, описанного в разделе 6.1, которое представляет собой открытое многоцентровое исследование 1-й фазы с увеличением доз и расширением периода введения доз, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, РК и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина у взрослых с NMIBC. (BCG=бацилла Кальмета-Герена; CIS=карцинома in situ; EV=энфортумаба ведотин; mTPI=модифицированный интервал вероятности токсичности; q3=раз в 3; q6=раз в 6; TURBT=трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря; еженедельно=раз в неделю. Предполагается безопасность при заданной дозе или исследование уровня дозы, который ниже или промежуточный по отношению к запланированным уровням дозы.)

5. Подробное описание

[0081] Прежде чем настоящее изобретение будет описано далее, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными вариантами осуществления, изложенными в данном документе, и также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для их ограничения.

[0082] Существует ряд факторов, которые необходимо учитывать при эффективном применении внутривезикулярного лечения, в том числе по меньшей мере объем инстилляций, время пребывания в организме, концентрацию дозы, общую дозу, pH инстилляций, pH мочи, снижение выработки мочи до и во время лечения и т. д., с тем чтобы достичь надлежащего баланса между эффективностью и безопасностью. В настоящем изобретении неожиданно было установлено, что концентрация дозы и общая доза являются наиболее важными факторами для эффективной и безопасной доставки ADC, такого как раскрываемый в данном документе ADC MMAE. В настоящем раскрытии данные сведения использованы для дальнейшей разработки различных способов, предусматривающих использование внутривезикулярного введения ADC для

лечения рака мочевого пузыря (например, рака мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC)).

5.1 Определения

[0083] К методикам и процедурам, описанным или упомянутым в данном документе, относятся методики и процедуры, которые в целом хорошо понятны и/или широко используются с применением традиционной методологии специалистами в данной области техники, такие как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3d ed. 2001); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., 2003); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An ed. 2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar ed. 2010); и в *Antibody Engineering Vols 1 and 2* (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010).

[0084] Если в данном документе не указано иное, технические и научные термины, применяемые в настоящем описании, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Для интерпретации данного описания будет применяться представленное далее описание терминов, и, когда это уместно, термины, используемые в форме единственного числа, также будут включать форму множественного числа и наоборот. В случае, если какое-либо описание изложенного термина противоречит какому-либо документу, включенному в данный документ посредством ссылки, изложенное ниже описание термина будет иметь преимущественную силу.

[0085] Термин «антитело», «иммуноглобулин» или «Ig» используют в данном документе взаимозаменяемо и используют в наиболее широком смысле, и конкретно он охватывает, например, моноклональные антитела (в том числе агонистические, антагонистические, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции с антителами с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или моновалентные антитела, мультивалентные антитела, мультиспецифические

антитела (например, биспецифические антитела при условии, что они характеризуются требуемой биологической активностью), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечных антител и их фрагментов, как описано ниже. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или с созревшей аффинностью, а также антителом от других видов, например, мыши и кролика и т. д. Подразумевается, что термин «антитело» включает полипептидный продукт В-клеток в составе класса полипептидов иммуноглобулина, который способен связываться со специфическим молекулярным антигеном и состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну тяжелую цепь (приблизительно 50-70 кДа) и одну легкую цепь (приблизительно 25 кДа), каждая аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельный участок, содержащий от приблизительно 100 до приблизительно 130 или более аминокислот, а каждая карбоксиконцевая часть каждой цепи включает константный участок. См., например, *Antibody Engineering* (Vorebaeck ed., 2d ed. 1995); и Kuby, *Immunology* (3d ed. 1997). В конкретных вариантах осуществления представленным в данном документе антителом может связываться специфический молекулярный антиген, включая полипептид или эпитоп. К антителам также относятся без ограничения синтетические антитела, полученные рекомбинантными методами антитела, камелизированные антитела, интраантитела, антиидиотипические (анти-Id) антитела и функциональные фрагменты (например, антигенсвязывающие фрагменты) любого из вышеперечисленных, которые относятся к части полипептида тяжелой или легкой цепи антитела, которая сохраняет некоторую или всю связывающую активность антитела, из которого был получен данный фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов (например, антигенсвязывающих фрагментов) включают одноцепочечные Fv (scFv) (например, в том числе моноспецифические, биспецифические и т. д.), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, F(ab)₂-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, связанные дисульфидными связями Fv (dsFv), Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, диатело, триатело, тетратело и миниантитело. В частности, к представленным в данном

документе антителам относятся молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном (например, один или несколько CDR антитела). Такие фрагменты антител можно найти, например, в Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1989); *Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (Myers ed., 1995); Huston *et al.*, 1993, *Cell Biophysics* 22:189-224; Plückthun and Skerra, 1989, *Meth. Enzymol.* 178:497-515; и в Day, *Advanced Immunochemistry* (2d ed. 1990). Представленные в данном документе антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина. Антитела могут быть агонистическими антителами или антагонистическими антителами.

[0086] Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, составляющие данную популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одной антигенной детерминанты. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые могут включать различные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

[0087] «Антиген» представляет собой структуру, с которой может селективно связываться антитело. Целевой антиген может представлять собой полипептид, углевод, нуклеиновую кислоту, липид, гаптен или другое природное или синтетическое соединение. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген представляет собой полипептид. В определенных вариантах осуществления антиген ассоциирован с клеткой, например, присутствует на клетке или в ней, например, раковой клетке.

[0088] «Интактное» антитело представляет собой антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, а также CL и, по меньшей мере, константные участки тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные участки могут включать человеческие константные участки или варианты их аминокислотных последовательностей. В определенных вариантах осуществления интактное антитело обладает одной или несколькими эффекторными функциями.

[0089] Термины «антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающий домен», «антигенсвязывающий участок» и подобные термины относятся к той части антитела, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и придают связывающему средству его специфичность и аффинность к антигену (например, CDR). Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает «фрагмент антитела», который содержит часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающий или переменный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, диатела и дидиатела (см., например, Holliger *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:6444-48; Lu *et al.*, 2005, J. Biol. Chem. 280:19665-72; Hudson *et al.*, 2003, Nat. Med. 9:129-34; WO 93/11161; и патенты США №№ 5837242 и 6492123), молекулы одноцепочечных антител (см., например, патенты США №№ 4946778, 5260203, 5482858 и 5476786), антитела с двойным переменным доменом (см., например, патент США № 7612181), антитела с одним переменным доменом (sdAb) (см., например, Woolven *et al.*, 1999, Immunogenetics 50: 98-101; и Streltsov *et al.*, 2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101:12444-49) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0090] Термины «связывает» или «связывание» относятся к взаимодействию между молекулами, включая, например, образование комплекса. Взаимодействия могут представлять собой, например, нековалентные взаимодействия, в том числе водородные связи, ионные связи, гидрофобные взаимодействия и/или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Комплекс также

может охватывать связывание двух или более молекул, удерживаемых вместе ковалентными или нековалентными связями, взаимодействиями или силами. Сила общих нековалентных взаимодействий между одним антигенсвязывающим сайтом на антителе и одним эпитопом целевой молекулы, такой как антиген, представляет собой аффинность антитела или функционального фрагмента к такому эпитопу. Соотношение скорости диссоциации (k_{off}) к скорости ассоциации (k_{on}) связывающей молекулы (например, антитела) с одновалентным антигеном (k_{off}/k_{on}) представляет собой константу диссоциации K_D , которая обратно пропорциональна аффинности. Чем ниже значение K_D , тем выше аффинность антитела. Величина K_D варьирует для разных комплексов антитела с антигеном и зависит как от k_{on} , так и от k_{off} . Константу диссоциации K_D для представленного в данном документе антитела можно определить с помощью любого представленного в данном документе способа или любого другого способа, хорошо известного специалистам в данной области техники. Аффинность к одному сайту связывания не всегда отражает истинную силу взаимодействия между антителом и антигеном. Когда сложные антигены, содержащие множественные повторяющиеся антигенные детерминанты, такие как поливалентный антиген, вступают в контакт с антителами, содержащими несколько сайтов связывания, взаимодействие антитела с антигеном в одном сайте увеличит вероятность реакции по второму сайту. Сила таких множественных взаимодействий между мультивалентным антителом и антигеном называется авидностью.

[0091] В отношении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, такие термины, как «связываются с», «которые специфически связываются с» и аналогичные термины также используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к связывающим молекулам с антигенсвязывающими доменами, которые специфически связываются с антигеном, таким как полипептид. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются или специфически связываются с антигеном, могут быть перекрестно-реактивными с родственными антигенами. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий

фрагмент, которые связываются или специфически связываются с антигеном, не вступает в перекрестную реакцию с другими антигенами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются или специфически связываются с антигеном, можно идентифицировать, например, с помощью иммуноанализа, Octet[®], Biacore[®] или других методик, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются или специфически связываются с антигеном, когда они связываются с антигеном с более высокой аффинностью, чем с любым перекрестно-реактивным антигеном, что определяют с помощью таких экспериментальных методик, как радиоиммуноанализы (RIA) и твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA). Как правило, специфическая или селективная реакция будет по меньшей мере в два раза превышать фоновый сигнал или шум и может превышать фон более чем в 10 раз. Рассмотрение специфичности связывания см., например, в *Fundamental Immunology* 332-36 (Paul ed., 2d ed. 1989). В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с «нецелевым» белком составляет менее приблизительно 10% от связывания связывающей молекулы или антигенсвязывающего домена с ее конкретным целевым антигеном, например, по результатам определения с помощью анализа методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или RIA. Что касается таких терминов, как «специфическое связывание», «специфически связывается с» или «специфичен к», они означают связывание, которое значительно отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу со схожей структурой, не обладающую связывающей активностью. Например, специфическое связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, которая сходна с целевой молекулой, например, избытком немеченной целевой молекулы. В данном случае о специфическом связывании свидетельствует, если связывание меченной целевой молекулы с зондом конкурентно ингибируется

избытком немеченной целевой молекулы. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном, охватывают антитело, которое способно связывать антиген с достаточной аффинностью, так чтобы связывающая молекула могла быть пригодной, например, в качестве диагностического средства при нацеливании на антиген. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном, характеризуются константой диссоциации (K_D), которая меньше или равна 1000 нМ, 800 нМ, 500 нМ, 250 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом антигена, который консервативен среди антигенов разных видов (например, у человека и яванского макака).

[0092] «Аффинность связывания» обычно относится к силе совокупности нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, связывающим белком, таким как антитело) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, применяемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность связывающей молекулы X к ее партнеру по связыванию Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе. Низкоаффинные антитела обычно медленно связывают антиген и имеют склонность легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно связывают антиген быстрее и имеют склонность оставаться связанными дольше. Из уровня техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых можно применять в контексте настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты осуществления включают следующие. В одном варианте осуществления « K_D » или «значение K_D » можно измерить с помощью

анализов, известных из уровня техники, например, с помощью анализа связывания. K_D можно измерить с помощью RIA, например, проводимого с Fab-версией представляющего интерес антитела и его антигена (Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293:865-81). K_D или значение K_D также можно измерить с помощью интерферометрии биослоя (BLI) или анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью Octet®, используя, например, систему Octet®QK384, или с помощью Biacore®, используя, например, Biacore®TM-2000 или Biacore®TM-3000. «Скорость прямой реакции», или «скорость ассоциации», или «скорость образования», или «кон» также можно определить с помощью тех же описанных выше методик интерферометрии биослоя (BLI) или поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя, например, Octet®QK384, систему Biacore®TM-2000 или Biacore®TM-3000.

[0093] В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут содержать «химерные» последовательности, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител при условии, что они характеризуются требуемой биологической активностью (см. патент США № 4816567; и Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55).

[0094] В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут содержать части «гуманизированных» форм отличных от человеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой химерные антитела, включающие человеческие иммуноглобулины (например, антитело-реципиент), в которых нативные остатки CDR заменены остатками из соответствующего CDR отличного от человека вида (например, донорского антитела), такого как мышь, крыса, кролик или отличный

от человека примат, обладающего требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях один или несколько остатков FR-участка человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими отличными от человеческих остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в антителе-доноре. Такие модификации сделаны для дополнительного улучшения эффективности антител. Тяжелая или легкая цепь гуманизированного антитела может содержать практически все, по меньшей мере один или несколько переменных участков, в которых все или практически все CDR соответствуют CDR отличного от человеческого иммуноглобулина, и все или практически все FR являются участками с последовательностью человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, участка человеческого иммуноглобулина. Более подробную информацию см. в Jones *et al.*, 1986, Nature 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-29; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-96; Carter *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89; в патентах США №№ 6800738, 6719971, 6639055, 6407213 и 6054297.

[0095] В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут содержать части «полностью человеческого антитела» или «человеческого антитела», при этом данные термины используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к антителу, которое содержит человеческий переменный участок и, например, человеческий константный участок. В конкретных вариантах осуществления данные термины относятся к антителу, которое содержит переменный участок и константный участок человеческого происхождения. «Полностью человеческие» антитела в определенных вариантах осуществления могут также охватывать антитела, которые связывают полипептиды и кодируются последовательностями нуклеиновых кислот, которые представляют собой встречающиеся в природе соматические варианты человеческой последовательности нуклеиновой кислоты иммуноглобулина эмбрионального

типа. Термин «полностью человеческое антитело» охватывает антитела, содержащие переменные и константные участки, соответствующие человеческим последовательностям иммуноглобулина эмбрионального типа, как описано у Kabat *et al.* (См. Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). «Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или было получено с помощью любой из методик получения человеческих антител. Данное определение человеческого антитела, в частности, исключает гуманизированное антитело, содержащее отличные от человеческих антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела можно получать с помощью различных методик, известных в данной области техники, в том числе библиотек фагового дисплея (Hoogenboom и Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581) и библиотек дрожжевого дисплея (Chao *et al.*, 2006, Nature Protocols 1: 755-68). Для получения человеческих моноклональных антител также доступны способы, описанные в Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985); Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol. 147(1):86-95; и в van Dijk and van de Winkel, 2001, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74. Человеческие антитела можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для продуцирования таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но чьи эндогенные локусы были дезактивированы, например, мышам (см., например, Jakobovits, 1995, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66; Brüggemann and Taussing, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58; и патенты США №№ 6075181 и 6150584 касательно технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li *et al.*, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62 касательно человеческих антител, полученных с помощью технологии человеческой гибридомы В-клеток.

[0096] В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут содержать части «рекомбинантного человеческого антитела», при этом данная фраза охватывает человеческие

антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессированные с применением рекомбинантного вектора экспрессии, введенного путем трансфекции в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, антитела, выделенные из животного (например, мыши или коровы), которое является трансгенным и/или трансхромосомным по человеческим генам иммуноглобулина (см., например, Taylor, L. D. *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который предусматривает сплайсинг последовательностей человеческих генов иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела могут содержать переменные и константные участки, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулина эмбрионального типа (см. Kabat, E. A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Однако в определенных вариантах осуществления, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, при применении животного, трансгенного по человеческим последовательностям Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*), и поэтому аминокислотные последовательности участков VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят от человеческих последовательностей VH и VL эмбрионального типа и родственны им, не могут естественным образом в условиях *in vivo* существовать в человеческом репертуаре антител эмбрионального типа.

[0097] В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут содержать часть «моноклонального антитела», при этом используемый в данном документе термин относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, например, индивидуальные антитела, составляющие данную популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций,

которые могут присутствовать в незначительных количествах, и каждое моноклональное антитело, как правило, будет распознавать один эпитоп на антигене. В конкретных вариантах осуществления используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» обозначает антитело, продуцируемое одной гибридомой или другой клеткой. Термин «моноклональное» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, моноклональные антитела, применимые в настоящем изобретении, можно получить с помощью гибридомной методологии, впервые описанной у Kohler *et al.*, 1975, Nature 256:495, или можно получить с помощью способов рекомбинантной ДНК в бактериальных или эукариотических клетках животных или растений (см., например, патент США. № 4816567). «Моноклональные антитела» также можно выделить из библиотек фаговых антител с помощью методик, описанных, например, в Clackson *et al.*, 1991, Nature 352:624-28 и Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581-97. Другие способы получения линий клональных клеток и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны из уровня техники. См., например, Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* eds., 5th ed. 2002).

[0098] Типичная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. В случае IgG 4-цепочечная единица обычно имеет массу приблизительно 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также содержит регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь содержит на N-конце переменный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) для каждой из α - и γ -цепей и четыре CH-домена для изоформ μ и ϵ . Каждая L-цепь содержит на N-конце переменный домен (VL), за которым на другом ее конце следует константный домен (CL). VL находится на одной линии с VH, а CL находится на одной линии с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Полагают, что определенные аминокислотные

остатки образуют границу раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Соединение пары VH и VL вместе образует единый антигенсвязывающий сайт. О структуре и свойствах разных классов антител см., например, *Basic and Clinical Immunology 71* (Stites *et al.* eds., 8th ed. 1994); и *Immunobiology* (Janeway *et al.* eds., 5th ed. 2001).

[0099] Термин «Fab» или «Fab-участок» относится к участку антитела, который связывается с антигенами. Стандартный IgG обычно состоит из двух Fab-участков, каждый из которых расположен на одном из двух плеч Y-образной структуры IgG. Каждый Fab-участок, как правило, состоит из одного переменного участка и одного константного участка каждой тяжелой и легкой цепи. Более конкретно, переменный участок и константный участок тяжелой цепи в Fab-участке представляют собой участки VH и CH1, а переменный участок и константный участок легкой цепи в Fab-участке представляют собой участки VL и CL. VH, CH1, VL и CL в Fab-участке могут быть организованы различными способами для придания антигенсвязывающей способности согласно настоящему изобретению. Например, участки VH и CH1 могут находиться на одном полипептиде, а участки VL и CL могут находиться на отдельном полипептиде, аналогично Fab-участку стандартного IgG. Альтернативно, все участки VH, CH1, VL и CL могут находиться в одном и том же полипептиде и ориентированы в разном порядке, как более подробно описано в разделах ниже.

[00100] Термин «переменный участок», «переменный домен», «V-участок» или «V-домен» относится к части легкой или тяжелой цепей антитела, которая обычно расположена на аминоконце легкой или тяжелой цепи и имеет длину приблизительно от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно от 100 до 110 аминокислот в легкой цепи и используется в связывании и специфичности каждого конкретного антитела к его конкретному антигену. Переменный участок тяжелой цепи может обозначаться как «VH». Переменный участок легкой цепи может обозначаться как «VL». Термин «переменный» относится к тому факту, что определенные сегменты

вариабельных участков сильно различаются по последовательности среди антител. V-участок опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределена по 110-аминокислотному интервалу вариабельных участков. Вместо этого V-участки состоят из менее вариабельных (например, относительно инвариантных) отрезков, называемых каркасными участками (FR), состоящими приблизительно из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками с большей вариабельностью (например, крайней вариабельностью), называемыми «гипервариабельными участками», каждый из которых имеет длину приблизительно 9-12 аминокислот. Каждый из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей содержит по четыре FR, в основном имеющих конфигурацию β -листа, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие структуру β -листа, а в некоторых случаях являются ее частью. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR и вместе с гипервариабельными участками из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см., например, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed. 1991)). Константные участки не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но характеризуются различными эффекторными функциями, такими как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Вариабельные участки сильно различаются по последовательности среди разных антител. В конкретных вариантах осуществления вариабельный участок является человеческим вариабельным участком.

[00101] Термин «нумерация остатков вариабельного участка по Kabat» или «нумерация положений аминокислот по Kabat» и его варианты относятся к системе нумерации, применяемой для вариабельных участков тяжелой цепи или вариабельных участков легкой цепи в компиляции антител в Kabat *et al.*, выше. При применении данной системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или

дополнительные аминокислоты, что соответствует укорочению или вставке в FR или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 и три вставленных остатка (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. по Kabat) после остатка 82. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания участков с гомологией последовательности антитела со «стандартной» последовательностью, пронумерованной по Kabat. Систему нумерации Kabat обычно используют при указании остатка в вариабельном домене (примерно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat *et al.*, выше). «Систему нумерации EU» или «индекс EU» обычно используют при указании остатка в константном участке тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, указанный в Kabat *et al.*, см. выше). «Индекс EU по Kabat» относится к нумерации остатков человеческого антитела IgG 1 по EU. Были описаны и другие системы нумерации, например, AbM, Chothia, контактным способом, IMGT и ANon.

[00102] Термин «тяжелая цепь» при его использовании по отношению к антителу относится к полипептидной цепи массой приблизительно 50-70 кДа, при этом аминоконцевая часть включает вариабельный участок массой от приблизительно 120 до 130 или более аминокислот, а карбоксиконцевая часть включает константный участок. Константный участок может относиться к одному из пяти различных типов (например, изотипов), называемых альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), в зависимости от аминокислотной последовательности константного участка тяжелой цепи. Отдельные тяжелые цепи различаются по размеру: α , δ и γ содержат примерно 450 аминокислот, тогда как μ и ϵ содержат примерно 550 аминокислот. В сочетании с легкой цепью эти отдельные типы тяжелых цепей дают начало пяти хорошо известным классам (например, изотипам) антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая четыре подкласса IgG, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[00103] Термин «легкая цепь» при его использовании по отношению к антителу относится к полипептидной цепи массой приблизительно 25 кДа, при этом аминоконцевая часть включает переменный участок массой от приблизительно 100 до приблизительно 110 или более аминокислот, а карбоксиконцевая часть включает константный участок. Примерная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. Существует два различных типа, называемых каппа (κ) или лямбда (λ), в зависимости от аминокислотной последовательности константных доменов.

[00104] Используемые в данном документе термины «гипервариабельный участок», «HVR», «определяющий комплементарность участок» и «CDR» используются взаимозаменяемо. «CDR» относится к одному из трех гипервариабельных участков (H1, H2 или H3) внутри некаркасного участка каркаса β -листа VH иммуноглобулина (Ig или антитела) или к одному из трех гипервариабельных участков (L1, L2 или L3) внутри некаркасного участка каркаса β -листа VL антитела. Соответственно, CDR представляют собой последовательности переменных участков, рассеянные среди последовательностей каркасных участков.

[00105] CDR-участки хорошо известны специалистам в данной области техники и были определены с помощью хорошо известных систем нумерации. Например, определяющие комплементарность участки (CDR) по системе Kabat основаны на изменчивости последовательности и являются наиболее часто используемыми (см., например, Kabat *et al.*, выше). Вместо этого, по системе Chothia указывают расположение структурных петель (см., например, Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-17). Конец петли CDRH1 по системе Chothia при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Kabat помещают вставки в H35A и H35B; если нет ни 35A, ни 35B, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные участки AbM представляют собой компромисс между CDR

по Kabat и структурными петлями по Chothia и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM от компании Oxford Molecular (см., например, *Antibody Engineering Vol. 2* (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010)). «Контактные» гипервариабельные участки определяют по результатам анализа доступных сложных кристаллических структур. Другой разработанной универсальной системой нумерации, которая получила широкое распространение, является информационная система ImMunoGeneTics (IMGT) Information System[®] (Lafranc *et al.*, 2003, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77). IMGT представляет собой интегрированную информационную систему, специализирующуюся на иммуноглобулинах (IG), рецепторах Т-клеток (TCR) и главном комплексе гистосовместимости (MHC) человека и других позвоночных. В данном документе CDR указаны как посредством аминокислотной последовательности, так и посредством местоположения в легкой или тяжелой цепи. Поскольку «местоположение» CDR в структуре вариабельного домена иммуноглобулина является консервативным у разных видов и присутствует в структурах, называемых петлями, с помощью систем нумерации, которые предусматривают выравнивание последовательностей вариабельного домена в соответствии со структурными элементами, можно легко выявить остатки CDR и каркасных участков. Данную информацию можно применять при прививке и замене остатков CDR из иммуноглобулинов одного вида в акцепторный каркасный участок, как правило из человеческого антитела. Дополнительная система нумерации (AHon) была разработана и представлена в Honegger and Plückthun, 2001, *J. Mol. Biol.* 309: 657-70. Соответствие между системой нумерации, в том числе, например, системой нумерации по Kabat и уникальной системой нумерации IMGT, хорошо известно специалисту в данной области техники (см., например, Kabat, выше; Chothia and Lesk, выше; Martin, выше; Lefranc *et al.*, выше). Остатки из каждого из данных гипервариабельных участков или CDR указаны в представленной ниже таблице 1.

Таблица 1

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

[00106] Границы данного CDR могут различаться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Таким образом, если не указано иное, термины «CDR» и «определяющий комплементарность участок» данного антитела или его участка, такой как переменный участок, а также отдельные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2) антитела или его участка следует понимать как охватывающие определяющий комплементарность участок, определяемый по любой из известных схем, описанных в данном документе выше. В некоторых случаях указывается схема идентификации конкретного CDR или CDR, например CDR, как определено способом Kabat, Chothia или контактными способом. В других случаях указывают конкретную аминокислотную последовательность CDR.

[00107] Гипервариабельные участки могут охватывать «расширенные гипервариабельные участки» следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2), и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26-35 или 26-35A (H1), 50-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH.

[00108] Термин «константный участок» или «константный домен» относится к карбоксиконцевой части легкой и тяжелой цепи, которая не принимает непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но характеризуется различными эффекторными функциями, такими как взаимодействие с Fc-рецептором. Данный термин относится к части молекулы иммуноглобулина, содержащей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, варибельным участком, который содержит антигенсвязывающий сайт. Константный участок может содержать участки CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи и участок CL легкой цепи.

[00109] Термин «каркас» или «FR» относится к таким остаткам варибельного участка, которые фланкируют CDR. Остатки FR присутствуют, например, в химерных, гуманизированных, человеческих доменных антителах, диателах, линейных антителах и биспецифических антителах. Остатки FR представляют собой такие остатки варибельного домена, которые отличаются от остатков гиперварибельного участка или остатков CDR.

[00110] Термин «Fc-участок» в данном документе используется для определения C-концевого участка тяжелой цепи иммуноглобулина, в том числе, например, Fc-участков с нативной последовательностью, рекомбинантных Fc-участков и вариантов Fc-участков. Хотя границы Fc-участка тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, зачастую определяют, что Fc-участок тяжелой цепи человеческого IgG простирается от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 и до ее карбоксильного конца. C-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc-участка может быть удален, например, во время получения или очистки антитела или путем рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может включать популяции антител со всеми удаленными остатками K447, популяции антител без удаленных остатков K447 и популяции антител, содержащие смесь антител с остатком K447 и без него. «Функциональный Fc-участок» обладает

«эффекторной функцией» Fc-участка нативной последовательности. Иллюстративные «эффекторные функции» включают связывание C1q, CDC, связывание Fc-рецептора, ADCC, фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и т. д. Для таких эффекторных функций обычно необходимо, чтобы Fc-участок был объединен со связывающим участком или связывающим доменом (например, варибельным участком или доменом антитела), и их можно оценить с помощью различных анализов, известных специалистам в данной области техники. «Вариант Fc-участка» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-участка нативной последовательности по меньшей мере на одну аминокислотную модификацию (например, замену, добавление или делецию). В определенных вариантах осуществления вариант Fc-участка имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-участком нативной последовательности или Fc-участком исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен или от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc-участке нативной последовательности или в Fc-участке исходного полипептида. Вариант Fc-участка в данном документе может обладать по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-участком нативной последовательности и/или с Fc-участком исходного полипептида или по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними, например, по меньшей мере приблизительно 95% гомологией с ними.

[00111] Используемый в данном документе термин «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и относится к локализованному участку антигена, с которым, может специфически связываться связывающая молекула (например, антитело). Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп или конформационный, нелинейный или прерывистый эпитоп. Например, в случае полипептидного антигена эпитоп может представлять собой смежные аминокислоты полипептида («линейный» эпитоп), или эпитоп может содержать аминокислоты из двух или более несмежных участков полипептида («конформационный», «нелинейный» или «прерывистый» эпитоп). Специалисту

в данной области техники будет понятно, что, как правило, линейный эпитоп может зависеть или не зависеть от вторичной, третичной или четвертичной структуры. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с группой аминокислот независимо от того, свернуты ли они в естественную трехмерную белковую структуру. В других вариантах осуществления для связывающей молекулы необходимо, чтобы аминокислотные остатки, составляющие эпитоп, имели определенную конформацию (например, изгиб, скручивание, поворот или складку) для распознавания и связывания эпитопа.

[00112] Термины «полипептид» и «пептид», а также «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к состоящим из аминокислот полимерам любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться отличными от аминокислот звеньями. Данные термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства, например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие манипуляции или модификации. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты, в том числе без ограничения неприродные аминокислоты, а также другие модификации, известные в данной области техники. Понятно, что, поскольку полипептиды по настоящему изобретению могут быть основаны на антителах или других представителях суперсемейства иммуноглобулинов, в определенных вариантах осуществления «полипептид» может встречаться в виде одной цепи или в виде двух или более связанных цепей.

[00113] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» означает, что он одобрен регуляторным органом Федерального правительства или правительства штата или внесен в перечень в Фармакопее США, Европейской Фармакопее или другой общепризнанной Фармакопее для применения на животных и, более конкретно, на людях.

[00114] «Вспомогательное средство» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, растворитель или инкапсулирующий материал. К вспомогательным средствам относятся, например, инкапсулирующие материалы или добавки, такие как ускорители всасывания, антиоксиданты, связующие вещества, буферы, носители, покрывающие средства, красители, разбавители, средства для улучшения распадаемости, эмульгаторы, сухие разбавители, наполнители, ароматизаторы, увлажнители, смазочные вещества, отдушки, консерванты, газы-вытеснители, антиадгезивы, стерилизующие средства, подсластители, солюбилизаторы, смачивающие средства и их смеси. Термин «вспомогательное средство» может также относиться к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному или неполному)) или среде.

[00115] В одном варианте осуществления каждый компонент является «фармацевтически приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами фармацевтического состава и пригоден для применения при контакте с тканью или органом людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, иммуногенности или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск. См., например, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.; Rowe et al., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd ed.; Ash and Ash Eds.; Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые вспомогательные средства в используемых дозировках и концентрациях являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, которые подвергаются их воздействию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое вспомогательное средство представляет собой водный раствор с забуференным рН.

[00116] Сокращение «ММАЕ» относится к монометилауристатину Е.

[00117] Если в контексте не указано иное, дефис (-) обозначает точку присоединения к макромолекуле с боковыми цепями.

[00118] Термин «химиотерапевтическое средство» относится ко всем химическим соединениям, которые эффективны в ингибировании роста опухоли. Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства; например азотистые иприты, этилениминовые соединения и алкилсульфонаты; антиметаболиты, например антагонисты фолиевой кислоты, пурина или пиримидина; ингибиторы митоза, например антитубулиновые средства, такие как алкалоиды барвинка, ауристатины и производные подофиллотоксина; цитотоксические антибиотики; соединения, которые повреждают или препятствуют экспрессии или репликации ДНК, например связующие вещества малой бороздки ДНК; и антагонисты рецепторов факторов роста. Кроме того, химиотерапевтические средства включают цитотоксические средства (определение которым дано в данном документе), антитела, биологические молекулы и малые молекулы.

[00119] Используемый в данном документе термин «консервативная замена» относится к заменам аминокислот, известным специалистам в данной области техники, и их можно осуществить, как правило, без изменения биологической активности полученной в результате молекулы. Специалисты в данной области техники поймут, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в несущественных участках полипептида практически не изменяют биологическую активность (см., например, Watson, *et al.*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Такие иллюстративные замены предпочтительно осуществляют в соответствии с изложенными в таблице 2 и таблице 3. Например, к таким изменениям относятся замена любым из изолейцина (I), валина (V) и лейцина (L) вместо любой другой из данных гидрофобных аминокислот; аспарагиновой кислотой (D) вместо глутаминовой кислоты (E) и наоборот; глутамином (Q) вместо аспарагина (N) и наоборот; и серином (S) вместо треонина (T) и наоборот. Другие замены также можно считать консервативными в зависимости

от окружения конкретной аминокислоты и ее роли в трехмерной структуре белка. Например, глицин (G) и аланин (A) часто могут быть взаимозаменяемыми, как и аланин (A) и валин (V). Метионин (M), который является относительно гидрофобным, часто можно заменять лейцином и изолейцином, а иногда и валином. Лизин (K) и аргинин (R) часто взаимозаменяемы в местоположениях, где важным признаком аминокислотного остатка является его заряд, а разные значения pK этих двух аминокислотных остатков не имеют значения. Опять же, другие изменения можно считать «консервативными» в определенных окружениях (см., например, таблицу 3 в данном документе; стр. 13-15 “Biochemistry” 2nd ED. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff *et al.*, PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei *et al.*, J Biol Chem 1995 May 19; 270(20):11882-11886). Другие замены также допустимы и могут быть определены эмпирически или в соответствии с известными консервативными заменами.

Таблица 2. Сокращения аминокислот

ОДНОБУКВЕННОЕ	ТРЕХБУКВЕННОЕ	ПОЛНОЕ НАЗВАНИЕ
F	Phe	фенилаланин
L	Leu	лейцин
S	Ser	серин
Y	Tyr	тирозин
C	Cys	цистеин
W	Trp	триптофан
P	Pro	пролин
H	His	гистидин
Q	Gln	глутамин
R	Arg	аргинин
I	Ile	изолейцин
M	Met	метионин
T	Thr	треонин
N	Asn	аспарагин
K	Lys	лизин

[00120] Термин «гомология» или «гомологичный» предназначен для обозначения сходства последовательностей между двумя полинуклеотидами или между двумя полипептидами. Сходство можно определить путем сравнения положения в каждой последовательности, которые можно выровнять для сравнения. Если данное положение в двух полипептидных последовательностях не идентично, сходство или консервативность данного положения можно определить путем оценки сходства аминокислоты в данном положении, например, согласно таблице 3. Степень сходства между последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для данных последовательностей. Выравнивание двух последовательностей для определения их процента сходства последовательностей можно выполнить с помощью программ, известных в данной области техники, таких как, например, описанные в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). Предпочтительно для выравнивания используют параметры по умолчанию, примеры которых изложены ниже. Одной программой выравнивания, хорошо известной в данной области техники, которую можно применять, является BLAST с заданными по умолчанию параметрами. В частности, данными программами являются BLASTN и BLASTP с использованием следующих параметров по умолчанию: генетический код = стандарт; фильтр = отсутствует; цепь = обе; предельное значение = 60; ожидание = 10; матрица = BLOSUM62; описания = 50 последовательностей; сортировать по = ВЫСОКИЙ ВЕСУ; базы данных = неизбыточные, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + трансляции GenBank CDS + SwissProtein + SPupdate + PIR. Подробную информацию о данных программах можно найти в Национальном центре биотехнологической информации.

[00121] Термин «гомологи» заданной аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты предназначен для обозначения того, что соответствующие последовательности «гомологов» обладают существенной идентичностью или гомологией с заданной аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты.

[00122] Определение процента идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот) можно осуществить с помощью математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268, модифицированный как в Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST из Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Поисковые запросы по нуклеотидным последовательностям BLAST можно осуществить с помощью набора параметров программы для нуклеотидных последовательностей NBLAST, например вес = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описываемым в данном документе. Поисковые запросы по белковым последовательностям BLAST можно выполнить с помощью набора параметров программы XBLAST, например вес 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковой молекуле, описанной в данном документе. Для получения выравнивания с введением гэпов для сравнения можно использовать Gapped BLAST, который описан у Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389 3402. В качестве альтернативы, для проведения итерированного поиска, который позволяет детектировать отдаленные связи между молекулами, можно применять PSI BLAST (там же). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети на сайте ncbi.nlm.nih.gov). Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версии 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании

программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно применять таблицу штрафов PAM120, штраф за удлинение гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4.

[00123] Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить с помощью методик, аналогичных описанным выше, с использованием гэпов или без них. При вычислении процента идентичности обычно учитывают только точные совпадения.

[00124] Термин «цитотоксическое средство» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает связанную с экспрессией активность клеток, функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Предполагается, что термин охватывает радиоактивные изотопы, химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, в том числе их фрагменты и/или варианты. Примеры цитотоксических средств включают без ограничения ауристатины (например, ауристин E, ауристин F, MMAE и MMAF), ауромицины, майтансиноиды, рицин, А-цепь рицина, комбрестатин, дуокармицины, доластатин, доксорубицин, даунорубицин, таксолы, цисплатин, сс1065, бромид этидия, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, дигидроксиантрациндион, актиномицин, дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas* (PE) A, PE40, абрин, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, альфа-сарцин, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин, курицин, кротин, калихеамицин, ингибитор *Saponaia officinalis* и глюкокортикоидные и другие химиотерапевтические средства, а также радиоизотопы, такие как At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹² или ²¹³, P³², и радиоактивные изотопы Lu, в том числе Lu¹⁷⁷. Антитела также могут быть конъюгированы с ферментом, активирующим противораковое пролекарство, способным превращать пролекарство в его активную форму.

[00125] Используемый в данном документе термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству связывающей молекулы (например, антитела) или фармацевтической композиции, представленной в данном документе, которого достаточно для получения требуемого результата.

[00126] Термины «субъект» и «пациент» можно использовать взаимозаменяемо. В контексте данного документа в определенных вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как отличное от примата млекопитающее (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса и т. д.) или примат (например, обезьяна и человек). В конкретных вариантах осуществления субъектом является человек. В одном варианте осуществления субъектом является млекопитающее, например, человек, у которого диагностировано патологическое состояние или нарушение. В другом варианте осуществления субъектом является млекопитающее, например, человек, подверженный риску развития патологического состояния или нарушения.

[00127] Термин «вводить» или «введение» относится к действию введения инъекции или иной физической доставки вещества в том виде, в котором оно существует вне организма пациента, такому как путем доставки через слизистую оболочку, внутрикожной, внутривенной, внутримышечной доставки и/или любым другим способом физической доставки, описанным в данном документе или известным в данной области техники.

[00128] Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение» и «осуществление лечения» относятся к уменьшению или облегчению прогрессирования, тяжести и/или продолжительности заболевания или патологического состояния, возникающего в результате применения одного или нескольких способов терапии. Лечение может быть определено путем оценки того, произошло ли уменьшение, ослабление и/или смягчение одного или нескольких симптомов, связанных с основным нарушением, так чтобы у

пациента наблюдалось улучшение несмотря на то, что пациент все еще может страдать от основного нарушения. Термин «осуществление лечения» включает как контроль заболевания, так и его облегчение. Термины «контролировать», «осуществление контроля» и «контроль» относятся к благоприятным эффектам, которые субъект получает в результате терапии, которая не обязательно приводит к излечению заболевания.

[00129] Термины «предупреждать», «осуществление предупреждения» и «предупреждение» относятся к снижению вероятности возникновения (или рецидива) заболевания, нарушения, патологического состояния или связанного(-ых) с ним симптома(-ов) (например, рака).

[00130] Термин «рак» или «раковая клетка» используется в данном документе для обозначения ткани или клетки, обнаруженной в новообразовании, которая обладает характеристиками, которые отличают ее от нормальной ткани или клеток ткани. К таким характеристикам относятся без ограничения степень анаплазии, неправильность формы, нечеткость контуров клеток, размер ядра, изменения структуры ядра или цитоплазмы, другие фенотипические изменения, наличие клеточных белков, указывающих на раковое или предраковое состояние, увеличенное количество митозов и способность к метастазированию. Слова, относящиеся к «раку», включают карциному, саркому, опухоль, эпителиому, лейкоз, лимфому, полип и сциррус, трансформацию, новообразование и тому подобное.

[00131] Используемый в данном документе термин «местнораспространенный» рак относится к раку, который распространился из места, где он начался, в близлежащие ткани или лимфатические узлы.

[00132] Используемый в данном документе термин «метастатический» рак относится к раку, который распространился из того места, где он начался, в другую часть организма.

[00133] Термин «внутрипузырное введение» относится к инстилляции терапевтического средства непосредственно в мочевого пузырь посредством введения уретрального катетера.

[00134] Термин «время пребывания в организме» относится к продолжительности времени, в течение которого терапевтическое вещество будет удерживаться в определенной части или органе (например, мочевом пузыре) подвергаемого лечению субъекта.

[00135] Термины «приблизительно» и «примерно» означают в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10%, в пределах 9%, в пределах 8%, в пределах 7%, в пределах 6%, в пределах 5%, в пределах 4%, в пределах 3%, в пределах 2%, в пределах 1% или менее от заданного значения или диапазона.

[00136] Используемые в настоящем описании и формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[00137] Понятно, что везде, где варианты осуществления описаны в данном документе с термином «содержащий», в ином случае также предусмотрены аналогичные варианты осуществления, описанные терминами «состоящий из» и/или «фактически состоящий из». Также понятно, что везде, где варианты осуществления описаны в данном документе с фразой «фактически состоящий из», в ином случае также предусмотрены аналогичные варианты осуществления, описанные терминами «состоящий из».

[00138] Термин «и/или», используемый в данном документе в такой фразе, как «А и/или В», подразумевают как включающий как А, так и В; А или В; А (отдельно) и В (отдельно). Аналогичным образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», подразумевают как охватывающий каждый из следующих вариантов осуществления: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[00139] Термин «вариант» относится к молекуле, которая характеризуется отклонением от описанного типа или нормы, такой как белок, который имеет один или несколько отличных аминокислотных остатков в соответствующем(-их) положении(-ях) специально описанного белка (например, белка 191P4D12, представленного на **фиг. 1А**.) Примером варианта белка является аналог. Дополнительными примерами вариантов являются сплайс-изоформы и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP).

[00140] К «белкам 191P4D12» и/или «родственным 191P4D12 белкам» по настоящему изобретению относятся белки, специально указанные в данном документе (см. **фиг. 1А**), а также аллельные варианты, варианты с консервативными заменами, аналоги и гомологи, которые можно выделить/создать и охарактеризовать без излишних экспериментов, следуя способам, изложенным в данном документе или общедоступным в данной области техники. Также включены слитые белки, которые объединяют части различных белков 191P4D12 или их фрагментов, а также слитые белки из белка 191P4D12 и гетерологичного полипептида. Такие белки 191P4D12 вместе называются родственными 191P4D12 белками, белками по настоящему изобретению или 191P4D12. Термин «родственный 191P4D12 белок» относится к полипептидному фрагменту или белковой последовательности 191P4D12, состоящей из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более 25 аминокислот; или по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 или более аминокислот. Термин «191P4D12» используется взаимозаменяемо с нектином-4.

5.2 Способы лечения рака мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC) у выбранных пациентов

[00141] В данном документе представлены способы лечения рака мочевого пузыря у субъектов-людей посредством внутривезикулярного введения конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), которое связывает 191P4D12.

[00142] В одном аспекте в данном документе представлены способы лечения рака мочевого пузыря у субъекта-человека, предусматривающие внутривезикулярное введение субъекту эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), где ADC содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12 и конъюгированы с одним или несколькими звеньями монометилауристатина E (MMAE).

[00143] В некоторых вариантах осуществления рак мочевого пузыря представляет собой рак мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC). В некоторых вариантах осуществления NMIBC был подтвержден гистологическим методом. В некоторых вариантах осуществления NMIBC представляет собой карциному *in situ* (CIS). В некоторых вариантах осуществления NMIBC был подтвержден гистологическим методом и представляет собой карциному *in situ* (CIS). В определенных вариантах осуществления, у субъекта имеется папиллярное заболевание. В определенных вариантах осуществления, у субъекта нет папиллярного заболевания. В определенных вариантах осуществления NMIBC был подтвержден гистологическим методом и где преобладающим гистологическим компонентом (>50%) является уротелиальная (переходно-клеточная) карцинома.

[00144] В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, имеется высокий риск развития заболевания, не дающего ответ на бациллу Кальмета-Герена (BCG). В определенных вариантах осуществления высокий риск развития заболевания, не дающего ответ на BCG, определяют как персистирующее или рецидивирующее заболевание CIS в отдельности или с рецидивирующим заболеванием T_a/T₁ (неинвазивное папиллярное

заболевание/опухоль с проникновением в субэпителиальную соединительную ткань) в пределах 12 месяцев после завершения надлежащей терапии посредством BCG. В определенных вариантах осуществления надлежащую терапию посредством BCG определяют как 5 из 6 доз начального индукционного курса плюс по меньшей мере 2 из 3 доз поддерживающей терапии. В определенных вариантах осуществления надлежащую терапию посредством BCG определяют как 5 из 6 доз начального индукционного курса плюс по меньшей мере 2 из 6 доз второго индукционного курса.

[00145] В некоторых вариантах осуществления для субъекта-человека, проходящего лечение согласно способам, представленным в данном документе, недопустима радикальная цистэктомия. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, отказывается от радикальной цистэктомии.

[00146] В некоторых вариантах осуществления все видимые папиллярные опухоли Ta/T1 у субъекта были полностью удалены посредством резекции в пределах 60 дней до лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется остаточная истинная CIS. В некоторых вариантах осуществления у субъекта нет остаточной истинной CIS.

[00147] В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, имеет удовлетворительную функцию мочевого пузыря и способность удерживать ADC, представленный в данном документе, при инстиляции в течение как минимум 1 часа, даже при приеме лекарственного средства для премедикации. В некоторых вариантах осуществления субъекту-человеку исполнилось по меньшей мере 18 лет. В некоторых вариантах осуществления расчетная продолжительность жизни субъекта-человека составляет более 2 лет.

[00148] В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной

онкологической группы (ECOG), равную 0. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 1. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 2. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 2, а скорость клубочковой фильтрации (GFR) субъекта составляет не менее 50 мл/мин, и у субъекта нет сердечной недостаточности III класса по системе Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).

[00149] В дополнительных вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, в том числе способов, описанных в предыдущих абзацах, субъекты-люди, в отношении которых можно применять способы, представленные в данном документе, представляют собой субъектов-людей с различными другими патологическими состояниями. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, абсолютное количество нейтрофилов (ANC) составляет не менее 1500/мкл. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, уровень гемоглобина (Hgb) составляет не менее 10 г/дл. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, количество тромбоцитов составляет не менее 100000/мкл. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, уровень сывороточного билирубина не превышает $1,5 \times$ верхнего предела нормы (ULN) или не более чем в 3 раза превышает ULN для субъектов с болезнью Жильбера. В некоторых

вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, расчетный клиренс креатинина (CrCl) составляет не менее 30 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления CrCl рассчитывают с помощью способа Кокрофта-Голта или уравнений модификации диеты при заболеваниях почек (MDRD); В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, GFR составляет не менее 30 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, функциональный статус по ECOG равен 2, а GFR составляет не менее 50 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, уровень аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) не превышает $3 \times \text{ULN}$. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, предложенными в данном документе, наблюдается состояние международного нормализационного индекса (INR) или протромбинового времени (PT), активированного частичного тромбoplastинового времени (aPTT) или частичного тромбoplastинового времени (PTT) не более $1,5 \text{ ULN}$, если только субъект не получает антикоагулянтную терапию, при условии, что PT или aPTT находится в пределах терапевтического диапазона предусмотренного применения антикоагулянтов. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, наблюдается более одного из описанных в данном абзаце состояний. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, наблюдаются все из описанных в данном абзаце состояний.

[00150] В других вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, в том числе способов, описанных в предыдущих абзацах, субъекты-люди, в отношении которых можно применять способы, представленные в данном документе, представляют собой субъектов-людей, у которых нет определенных состояний. В некоторых вариантах осуществления у

субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет в анамнезе текущей или предыдущей уротелиальной карциномы с инвазией в мышечный слой (т. е. заболевания T2, T3 или T4) или метастатического заболевания. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет узлового или метастатического заболевания, видимого на компьютерной томографии (СТ) или магнитно-резонансной томографии (MRI), проведенной в пределах 3 месяцев до лечения посредством ADC. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет сопутствующей уротелиальной карциномы верхних отделов мочеточника, наблюдаемой на урограмме СТ или MRI с контрастированием органов брюшной полости/таза, проведенной в пределах 3 месяцев до лечения посредством ADC. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет в анамнезе предшествующей или сопутствующей уротелиальной карциномы простатической части уретры в пределах 6 месяцев до лечения посредством ADC. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, до введения ADC нет связанного с опухолью гидронефроза. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, не получал системную противораковую терапию (например, химиотерапию, биологическую терапию, иммунотерапию, целенаправленную терапию, эндокринную терапию, исследуемое средство) в пределах 4 недель до первой дозы исследуемого средства лечения способами, представленными в данном документе, или любую внутривезикулярную терапию для лечения NMIBC в пределах 6 недель до начала лечения способами, представленными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, получил однократную инстилляцию цитотоксических средств (например, митомицина С, доксорубицина и гемцитабина) сразу после процедуры TURBT,

за 14-60 дней до начала лечения способами, представленными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет постоянных симптомов (2-й степени тяжести и выше), вторичных по отношению к нежелательным явлениям (АЕ), связанным с предшествующей терапией в отношении NMIBC. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, ранее не проходил курс облучения мочевого пузыря для лечения уротелиального рака. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет активной инфекции, при этом субъект прошел лечение системными (например, пероральными или внутривенными) антибиотиками в пределах 14 дней до начала лечения посредством ADC. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, переносит внутривезикулярное введение дозы или внутривезикулярные хирургические манипуляции. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, в анамнезе нет сведений о злокачественном новообразовании в пределах 3 лет до начала лечения способами, представленными в данном документе, или любых сведений об остаточном заболевании после ранее диагностированного злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, незначительный риск метастазирования или смертельного исхода (например, вероятность 5-летней общей продолжительности жизни [OS] $\geq 90\%$), такого как подвергнутый надлежащему лечению CIS шейки матки, немеланомная карцинома кожи, протоковая CIS молочной железы или I стадия рака матки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, в анамнезе присутствуют сведения о раке предстательной железы (T2N0M0 или ниже с оценкой в баллах по шкале Глисона ≤ 7), который был подвергнут лечению с определенным намерением

(хирургической или лучевой терапии) по меньшей мере за 1 год до лечения способами, представленными в данном документе, при условии, что субъект считается не болеющим раком предстательной железы и соблюдены следующие критерии: (1) субъекты, перенесшие радикальную простатэктомию, должны иметь недетектируемый простатспецифический антиген (PSA) в течение >1 года до введения ADC, и (2) субъекты, прошедшие курс облучения, должны иметь время удвоения уровня PSA >1 года (на основе по меньшей мере 3 значений, определенных с интервалом >1 месяца) и значение общего уровня PSA, которое не соответствует критериям Феникса для биохимического рецидива (т. е. <2,0 нг/мл выше максимального снижения уровня нейтрофилов, обусловленного проведением химиотерапии). В некоторых вариантах осуществления субъект-человек, получающий лечение способами, представленными в данном документе, не подвергался предыдущему воздействию нацеленной на нектин-4 терапии или средству, содержащему монометилауристатин E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, предложенными в данном документе, нет аутоиммунного или воспалительного нарушения кожи. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет псориаза или атопического дерматита. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет продолжающейся сенсорной или двигательной нейропатии 2-й степени тяжести или выше. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет положительного поверхностного антигена гепатита В и/или корового антитела к антигену гепатита В. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, есть отрицательный результат анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на гепатит В, и он получает соответствующую противовирусную профилактику. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет активной

инфекции гепатита С или известной инфекции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет активного туберкулеза. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет неконтролируемого диабета. В некоторых вариантах осуществления неконтролируемый диабет определяют как наличие у субъекта уровня гемоглобина A1c (HbA1c) $\geq 8\%$ или HbA1c от 7% до $< 8\%$ с сопутствующими симптомами диабета (полиурией или полидипсией). В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, не было явления, связанного с сосудами головного мозга (инсульта или транзиторной ишемической атаки), нестабильной стенокардии, инфаркта миокарда или сердечных симптомов, соответствующих III-IV классу по NYHA, в пределах 6 месяцев до введения первой дозы энфортумаба ведотина. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет тяжелой (≥ 3 -й степени тяжести) гиперчувствительности к энфортумаба ведотину или к любому вспомогательному средству, содержащемуся в лекарственном составе с энфортумаба ведотином (например, гистидину, дигидрату трегалозы и/или полисорбату 20). В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, нет активного кератита или изъязвлений роговицы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта-человека, получающего лечение способами, представленными в данном документе, есть поверхностный точечный кератит.

[00151] В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, применяют для лечения субъектов с раком мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC), у которых присутствует экспрессия РНК 191P4D12, экспрессия белка 191P4D12 или экспрессия как РНК 191P4D12, так и белка 191P4D12.

[00152] В некоторых вариантах осуществления экспрессию РНК 191P4D12 при раке определяют посредством гибридизации полинуклеотидов, секвенирования (оценки относительного содержания последовательностей) и/или ПЦР (в том числе RT-PCR). В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка 191P4D12 при раке определяют с помощью ИНС, анализа методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) и/или вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка 191P4D12 при различных формах рака определяют более чем одним способом. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка 191P4D12 при различных формах рака определяют двумя способами ИНС.

[00153] В некоторых вариантах осуществления рак мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC) подтверждают гистологическими, цитологическими или как гистологическими, так и цитологическими методами.

[00154] В другом аспекте в данном документе представлены способы лечения NMIBC у субъекта-человека, предусматривающие введение субъекту эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством, где конъюгат антитела с лекарственным средством содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12, конъюгированы с одним или несколькими звеньями монометилауристатина Е (ММАЕ), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO:22, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO:23; и где субъект обладает любой из подходящих характеристик, представленных в разделе 6.

[00155] В другом аспекте в данном документе представлен способ предупреждения или лечения рака у субъекта-человека, предусматривающие

введение субъекту эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством, где конъюгат антитела с лекарственным средством содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12, конъюгированы с одним или несколькими звеньями монометилауристатина E (MMAE), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO:22, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO:23; и где рак обладает любым из подходящих маркеров и/или характеристик, представленных в разделе 6.

[00156] В еще одном аспекте в данном документе представлен способ предупреждения или лечения рака у субъекта-человека, предусматривающий введение субъекту эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством, где конъюгат антитела с лекарственным средством содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12, конъюгированы с одним или несколькими звеньями монометилауристатина E (MMAE), и где субъект обладает любой из подходящих характеристик, представленных в разделе 6. В дополнительном аспекте в данном документе представлен способ предупреждения или лечения рака у субъекта-человека, предусматривающий введение субъекту эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством, где конъюгат антитела с лекарственным средством содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12, конъюгированы с одним или несколькими звеньями монометилауристатина E (MMAE), и где рак обладает любым из подходящих маркеров и/или характеристик, представленных в разделе 6.

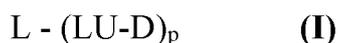
[00157] Во всех способах, представленных в данном документе, и особенно в способах, описанных в предыдущих абзацах, ADC, которые можно применять, описаны в разделах 3, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 и 6, отбор пациентов для лечения описан в данном документе и проиллюстрирован в данном разделе (разделе 5.2) и разделах 3 и 6, схемы введения доз и фармацевтическая композиция для введения терапевтического средства описаны ниже в разделах 5.4, 5.6 и 6, биомаркеры, которые можно применять для идентификации терапевтических средств, отбора пациентов, определения результата данных способов и/или которые каким-либо образом служат критериями для данных способов, описаны в данном документе и проиллюстрированы в данном разделе и разделе 6, биомаркеры можно определять так, как описано в разделе 5.7, или так, как известно из уровня техники, терапевтические результаты способов, представленных в настоящем документе, описаны в данном разделе (разделе 5.2) и разделах 3 и 6, дополнительные терапевтические результаты способов, представленных в данном документе, могут представлять собой улучшение показателей биомаркеров, описанных в данном документе, например, описанных и проиллюстрированных в данном разделе (разделе 5.2) и разделах 3 и 6, и комбинированные терапии, включающие ADC и другие терапевтические средства, описаны в данном разделе и в разделе 5.5. Следовательно, специалист в данной области техники поймет, что представленные в данном документе способы предусматривают все перестановки и комбинации пациентов, терапевтических средств, схем введения доз, биомаркеров и терапевтических результатов, которые описаны выше и ниже.

5.3 Конъюгаты антитела с лекарственным средством для способов

[00158] В различных вариантах осуществления представленных в данном документе способов, в том числе способов, представленных в разделе 5.2, применяемый в способах ADC содержит или представляет собой ADC к 191P4D12, описанный в данном документе и/или в патенте США № 8637642, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела к 191P4D12

с лекарственным средством, представленный для способов, описанных в данном документе, содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12, как представлено в данном документе, в том числе в разделах 3, 5.3.1 и 6, конъюгированные с одним или несколькими звеньями цитотоксических средств (лекарственными звеньями или D), как представлено в данном документе, в том числе в разделах 3 и 6 и данном разделе (разделе 5.3) с дополнительным раскрытием в разделах 5.3.2 и 5.3.4. В определенных вариантах осуществления цитотоксические средства (лекарственные звенья или D) могут быть ковалентно связаны напрямую или посредством линкерного звена (LU), как представлено в данном документе, в том числе в разделах 3 и 6 и данном разделе (разделе 5.3) с дополнительным раскрытием в разделе 5.3.3.

[00159] В некоторых вариантах осуществления соединение по типу конъюгата антитела с лекарственным средством характеризуется следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль или сольват; где

L представляет собой звено на основе антитела, например антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, например, как представлено в разделах 3, 5.3.1, и 6, и

(LU-D) представляет собой фрагмент из линкерного звена и лекарственного звена, где

LU- представляет собой линкерное звено, например, как указано в разделах 3 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3) с дополнительным раскрытием в разделе 5.3.3, и

D представляет собой лекарственное звено, обладающее цитостатической или цитотоксической активностью против целевой клетки, например, как представлено в разделах 3 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3) с дополнительным раскрытием в разделах 5.3.2 и 5.3.4; и

р представляет собой целое число от 1 до 20 с дополнительными примерами, приведенными в разделах 3 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3).

[00160] В некоторых вариантах осуществления р варьирует от 1 до 20, от 1 до 19, от 1 до 18, от 1 до 17, от 1 до 16, от 1 до 15, от 1 до 14, от 1 до 13, от 1 до 12, от 1 до 11, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления р варьирует от 2 до 20, от 2 до 19, от 2 до 18, от 2 до 17, от 2 до 16, от 2 до 15, от 2 до 14, от 2 до 13, от 2 до 12, от 2 до 11, от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В некоторых вариантах осуществления р варьирует от 3 до 20, от 3 до 19, от 3 до 18, от 3 до 17, от 3 до 16, от 3 до 15, от 3 до 14, от 3 до 13, от 3 до 12, от 3 до 11, от 3 до 10, от 3 до 9, от 3 до 8, от 3 до 7, от 3 до 6, от 3 до 5 или от 3 до 4. В некоторых вариантах осуществления р равно

приблизительно 1.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 2.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 3.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 4.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 3,8.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 5.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 6.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 7.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 8.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 9.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 10.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 11.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 12.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 13.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 14.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 15.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 16.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 17.	В некоторых вариантах осуществления р равно
приблизительно 18.	В некоторых вариантах осуществления р равно

приблизительно 19. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 20.

[00161] В некоторых вариантах осуществления соединение по типу конъюгата антитела с лекарственным средством характеризуется следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль или сольват; где

L представляет собой звено на основе антитела, например антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, например, как представлено в разделах 3, 5.3.1, и 6, и

-A_a-W_w-Y_y- представляет собой линкерное звено (LU), где:

-A- представляет собой растягивающееся звено,

а равно 0 или 1,

каждое -W- независимо представляет собой аминокислотную звено,

w представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 12,

-Y- представляет собой саморазрушающееся спейсерное звено,

y равно 0, 1 или 2,

каждый, например, как указано в разделах 3 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3) с дополнительным раскрытием в разделе 5.3.3;

D представляет собой лекарственные звенья, обладающие цитостатической или цитотоксической активностью против целевой клетки, например, как представлено в разделах 3 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3) с дополнительным раскрытием в разделах 5.3.2 и 5.3.4; и

p представляет собой целое число от 1 до 20 с дополнительными примерами, приведенными в разделах 3 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3).

[00162] В некоторых вариантах осуществления a равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а u равно 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а u равно 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления r варьирует от 1 до 20, от 1 до 19, от 1 до 18, от 1 до 17, от 1 до 16, от 1 до 15, от 1 до 14, от 1 до 13, от 1 до 12, от 1 до 11, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления r варьирует от 2 до 20, от 2 до 19, от 2 до 18, от 2 до 17, от 2 до 16, от 2 до 15, от 2 до 14, от 2 до 13, от 2 до 12, от 2 до 11, от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В некоторых вариантах осуществления r варьирует от 3 до 20, от 3 до 19, от 3 до 18, от 3 до 17, от 3 до 16, от 3 до 15, от 3 до 14, от 3 до 13, от 3 до 12, от 3 до 11, от 3 до 10, от 3 до 9, от 3 до 8, от 3 до 7, от 3 до 6, от 3 до 5 или от 3 до 4. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 3. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 4. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 3,8. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 5. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 6. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 7. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 9. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 10. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 11. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 12. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 13. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 14. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 15. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 16. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 17. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 18. В некоторых вариантах

осуществления r равно приблизительно 19. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 20. В некоторых вариантах осуществления, если w не равно нулю, u равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления, если w равно от 1 до 12, u равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления w равно от 2 до 12, а u равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a равно 1, а w и u равны 0.

[00163] В некоторых конкретных вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, в том числе способов, представленных в разделе 5.2, цитотоксическое средство в составе любого из ADC, представленных в данном документе для способов, содержит, состоит из или представляет собой MMAE.

[00164] В случае композиций, содержащих множество антител или их антигенсвязывающих фрагментов, содержание лекарственного средства представлено посредством r , средним количеством молекул лекарственного средства на звено на основе антитела. Содержание лекарственного средства может варьировать от 1 до 20 лекарственных средств (D) на антитело. Среднее количество лекарственных средств на антитело при подготовке реакций конъюгации можно охарактеризовать с помощью традиционных способов, таких как масс-спектроскопия, ELISA-анализ и HPLC. Также количественное распределение конъюгатов антитела с лекарственным средством можно определить по показателю r . В некоторых случаях отделение, очистку и изучение характеристик гомогенных конъюгатов антитела с лекарственным средством, где r представляет собой определенное значение, от конъюгатов антитела с лекарственным средством с другим содержанием лекарственного средства можно осуществить с помощью таких способов, как обращенно-фазовая HPLC или электрофорез. В определенных иллюстративных вариантах осуществления r составляет от 2 до 8.

[00165] Дополнительные варианты осуществления ADC для способов, представленных в данном документе, были описаны в публикации патента США

№ 8637642 и международной заявке № PCT/US2019/056214 (публикации № WO2020/117373), обе из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[00166] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, в том числе в разделах 3, 5.2 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3), ADC представляет собой энфортумаба ведотин. В определенных вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, в том числе в разделах 3, 5.2 и 6 и в данном разделе (разделе 5.3), ADC представляет собой биоаналог энфортумаба ведотина.

5.3.1 Антитела или антигенсвязывающие фрагменты к 191P4D12

[00167] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с родственными нектину-4 белками, представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком нектином-4, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2 (см. **ФИГ. 1А**). Соответствующая кДНК, кодирующая белок 191P4D12, характеризуется последовательностью под SEQ ID NO:1 (см. **ФИГ. 1А**).

[00168] К антителу, которое специфически связывается с белком нектином-4, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2, относятся антитела, которые могут связываться с другими родственными нектину-4 белками. Например, антитела, которые связывают белок нектин-4, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2, могут связывать родственные нектину-4 белки, такие как варианты нектина-4 и их гомологи или аналоги.

[00169] В некоторых вариантах осуществления представленное в данном документе антитело к нектину-4 представляет собой моноклональное антитело.

[00170] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4

(последовательность кДНК под SEQ ID NO:3), и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 (последовательность кДНК под SEQ ID NO:5), которые представлены на **ФИГ. 1В** и **1С**.

[00171] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарности участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 136-й аминокислоты (серина) последовательности под SEQ ID NO:7), и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из переменного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 130-й аминокислоты (аргинина) последовательности под SEQ ID NO:8). В определенных вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющий комплементарности участок 1 (CDR-H1), CDR-H2 и CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности соответствующих CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в последовательности переменного участка тяжелой цепи, изложенном под SEQ ID NO:22 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 136-й аминокислоты (серина) последовательности под SEQ ID NO:7), и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности соответствующих CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3 в переменном участке легкой цепи, изложенном под SEQ ID NO:23 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 130-й аминокислоты (аргинина) последовательности под SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его

антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки (CDR), состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 136-й аминокислоты (серина) последовательности под SEQ ID NO:7), и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 130-й аминокислоты (аргинина) последовательности под SEQ ID NO:8). В определенных вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющий комплементарность участок 1 (CDR-H1), CDR-H2 и CDR-H3, состоящие из аминокислотных последовательностей соответствующих CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в последовательности переменного участка тяжелой цепи, изложенном под SEQ ID NO:22 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 136-й аминокислоты (серина) последовательности под SEQ ID NO:7), и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, состоящие из аминокислотных последовательности соответствующих CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3 в переменном участке легкой цепи, изложенном под SEQ ID NO:23 (который представляет собой аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 130-й аминокислоты (аргинина) последовательности под SEQ ID NO:8). SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8 представлены на **ФИГ. 1D** и **1E** и приведены ниже:

SEQ ID NO:22

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSYIS
SSSSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGM
DVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:23

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAAS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKR

SEQ ID NO:7

MELGLCWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYN
MNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQMNSL
RDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:8

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIG
WLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00172] Последовательности CDR можно определить согласно хорошо известным системам нумерации. Как описано выше, CDR-участки хорошо известны специалистам в данной области техники и были определены с помощью хорошо известных систем нумерации. Например, определяющие комплементарность участки (CDR) по системе Kabat основаны на

вариабельности последовательности и являются наиболее часто используемыми (см., например, Kabat *et al.*, выше). Вместо этого, по системе Chothia указывают расположение структурных петель (см., например, Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-17). Конец петли CDRH1 по системе Chothia при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Kabat помещают вставки в H35A и H35B; если нет ни 35A, ни 35B, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные участки AbM представляют собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM от компании Oxford Molecular (см., например, Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010)). «Контактные» гипервариабельные участки определяют по результатам анализа доступных сложных кристаллических структур. Другой разработанной универсальной системой нумерации, которая получила широкое распространение, является информационная система ImMunoGeneTics (IMGT) Information System[®] (Lafranc *et al.*, 2003, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77). IMGT представляет собой интегрированную информационную систему, специализирующуюся на иммуноглобулинах (IG), рецепторах Т-клеток (TCR) и главном комплексе гистосовместимости (MHC) человека и других позвоночных. В данном документе CDR указаны как посредством аминокислотной последовательности, так и посредством местоположения в легкой или тяжелой цепи. Поскольку «местоположение» CDR в структуре вариабельного домена иммуноглобулина является консервативным у разных видов и присутствует в структурах, называемых петлями, с помощью систем нумерации, которые предусматривают выравнивание последовательностей вариабельного домена в соответствии со структурными элементами, можно легко выявить остатки CDR и каркасных участков. Данную информацию можно применять при прививке и замене остатков CDR из иммуноглобулинов одного вида в акцепторный каркасный участок, как правило из человеческого антитела. Дополнительная

система нумерации (AHon) была разработана и представлена в Honegger and Plückthun, 2001, J. Mol. Biol. 309: 657-70. Соответствие между системой нумерации, в том числе, например, системой нумерации по Kabat и уникальной системой нумерации IMGT, хорошо известно специалисту в данной области техники (см., например, Kabat, выше; Chothia and Lesk, выше; Martin, выше; Lefranc *et al.*, выше). Остатки из каждого из данных гипервариабельных участков или CDR указаны в представленной выше таблице 1.

[00173] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации по Kabat, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации по Kabat.

[00174] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации AbM, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации AbM.

[00175] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации по Chothia, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие

аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации по Chothia.

[00176] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно контактной нумерации, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно контактной нумерации.

[00177] В еще одних вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации IMGT, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации IMGT.

[00178] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из вариабельного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации по Kabat, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR, состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из вариабельного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации по Kabat.

[00179] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи,

содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации по AbM, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации по AbM.

[00180] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации по Chothia, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации по Chothia.

[00181] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно контактной нумерации, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно контактной нумерации.

[00182] В еще одних вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), состоящие из аминокислотных последовательностей CDR из переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22 согласно нумерации IMGT, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, состоящие из

аминокислотных последовательностей CDR из варибельного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23 согласно нумерации IMGT.

[00183] Как описано выше, последовательности CDR согласно различным системам нумерации можно легко определить, например, с помощью онлайн-инструментария, такого как инструментарий, представленный под названием Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI). Например, в представленной ниже таблице 4 приведены последовательности CDR тяжелой цепи в последовательности под SEQ ID NO:22 и последовательности CDR легкой цепи в последовательности под SEQ ID NO:23 согласно нумерации по Kabat, определенные с помощью инструментария ANARCI.

Таблица 4

	VH из SEQ ID NO:22	VL из SEQ ID NO:23
CDR1	SYNMN (SEQ ID NO:9)	RASQGISGWL (SEQ ID NO:12)
CDR2	YISSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:10)	AASTLQS (SEQ ID NO:13)
CDR3	AYYYGMDV (SEQ ID NO:11)	QQANSFPPT (SEQ ID NO:14)

[00184] В качестве другого примера, в представленной ниже таблице 5 приведены последовательности CDR тяжелой цепи в последовательности под SEQ ID NO:22 и последовательности CDR легкой цепи в последовательности под SEQ ID NO:23 согласно нумерации IMGT, определенные с помощью инструментария ANARCI.

Таблица 5

	VH из SEQ ID NO:22	VL из SEQ ID NO:23
CDR1	GFTFSSYN (SEQ ID NO:16)	QGISGW (SEQ ID NO:19)
CDR2	ISSSSTI (SEQ ID NO:17)	AAS (SEQ ID NO:20)
CDR3	ARAYYYGMDV (SEQ ID NO:18)	QQANSFPPT (SEQ ID NO:21)

[00185] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:9, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10, CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11, CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:13, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:14.

[00186] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:16, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:17, CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:18, CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:19, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:21.

[00187] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:9, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:10, CDR-H3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:11, CDR-L1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:12, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:13, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:14.

[00188] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:16, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:17, CDR-H3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:18, CDR-L1, состоящий из

аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:19, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:21.

[00189] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:22, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:23.

[00190] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:22, и вариабельный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:23.

[00191] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8.

[00192] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8.

[00193] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена(-ы) модификация(-и) аминокислотной последовательности описанных в данном документе антител. Например, может быть необходимо оптимизировать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела, в том числе без ограничения специфичность, термостабильность, уровень экспрессии, эффекторные функции, гликозилирование, пониженную иммуногенность или растворимость. Поэтому в дополнение к описанным в данном документе антителам предусмотрено, что можно получить варианты антител. Например, варианты антител можно получить путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующую ДНК и/или путем синтеза требуемого антитела или полипептида. Специалисты в данной области техники поймут, что аминокислотные изменения могут изменить посттрансляционные процессы для антитела, как например, изменить количество или положение сайтов гликозилирования или изменить характеристики заякоривания в мембрану.

[00194] В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе антитела модифицированы химическими методами, например, путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу. К производным антител могут относиться антитела, которые были модифицированы химическими методами, например путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществить с помощью известных методик, в том числе без ограничения специфического химического расщепления, ацетилирования, составления, метаболического синтеза туникамицина и т. д. Кроме того, антитело может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

[00195] Вариации могут представлять собой замену, делецию или вставку одного или нескольких кодонов, кодирующих однодоменное антитело или полипептид, что приводит к изменению аминокислотной последовательности по

сравнению с первоначальным антителом или полипептидом. Аминокислотные замены могут быть осуществлены в результате замены одной аминокислоты на другую аминокислоту, характеризующуюся схожими структурными и/или химическими свойствами, такой как замена лейцина на серин, например, консервативные аминокислотные замены. Для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую представленную в данном документе молекулу, можно применять стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, в том числе, например, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, который приводит к получению аминокислотных замен. Вставки или делеции необязательно могут иметь длину в диапазоне от приблизительно 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замена, делеция или вставка включает менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен относительно первоначальной молекулы. В конкретном варианте осуществления замена представляет собой консервативную аминокислотную замену, произведенную по одному или нескольким спрогнозированным заменимым аминокислотным остаткам. Допустимую вариацию можно определить путем систематического внесения вставок, делеций или замен аминокислот в последовательность и тестирования полученных вариантов в отношении активности, наблюдаемой у исходных антител.

[00196] К аминокислотным вставкам в последовательность относятся слияния с амино- и/или карбоксильными концами длиной в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих множество остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком.

[00197] В настоящее раскрытие включены антитела, получаемые с помощью консервативных аминокислотных замен. При консервативной аминокислотной

замене аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, содержащий боковую цепь со схожим зарядом. Как описано выше, в данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, содержащих боковые цепи со схожими зарядами. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В качестве альтернативы, во всю или часть кодирующей последовательности мутации можно вводить случайным образом, например насыщающим мутагенезом, а полученные мутанты можно подвергнуть скринингу в отношении биологической активности для выявления мутантов, которые сохраняют активность. После мутагенеза кодируемый белок можно получить посредством экспрессии и можно измерить активность белка, консервативные (например, в пределах группы аминокислот со схожими свойствами и/или боковыми цепями) замены можно ввести с целью сохранения или незначительного изменения характеристик.

[00198] Аминокислоты можно сгруппировать по сходству свойств их боковых цепей (см., например, Lehninger, *Biochemistry* 73-75 (2d ed. 1975)): (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) кислые: Asp (D), Glu (E); и (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H). В качестве альтернативы, встречающиеся в природе остатки можно разделить на группы по общим свойствам боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[00199] Например, любой остаток цистеина, не вовлеченный в поддержание надлежащей конформации антитела, также можно заменить, например, на другую аминокислоту, такую как аланин или серин, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предупреждения неправильного сшивания.

[00200] Вариации можно осуществить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как олигонуклеотид-опосредованный (сайт-направленный) мутагенез, аланиновое сканирование и ПЦР-мутагенез. Сайт-направленный мутагенез (см., например, Carter, 1986, *Biochem J.* 237:1-7; и Zoller *et al.*, 1982, *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500), кассетный мутагенез (см., например, Wells *et al.*, 1985, *Gene* 34:315-23) или другие известные методики можно осуществлять на клонированной ДНК с получением ДНК варианта антитела к MSLN.

[00201] Ковалентные модификации антител включены в объем настоящего изобретения. К ковалентным модификациям относится реакция целевых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим средством, которое может вступать в реакцию с избранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками антитела. К другим модификациям относятся дезамидирование глутаминильных и аспарагинильных остатков в соответствующие глутамильные и аспартильные остатки соответственно, гидроксильное пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование α -аминогрупп лизиновых, аргининовых и гистидиновых боковых цепей (см., например, Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* 79-86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

[00202] К другим типам ковалентной модификации антитела, включенным в объем настоящего изобретения, относятся изменение природного паттерна гликозилирования антитела или полипептида (см., например, Beck *et al.*, 2008, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:482-501; и Walsh, 2010, *Drug Discov. Today* 15:773-80)

и связывание антитела с одним из ряда небелковых полимеров, например: полиэтиленгликолем (PEG), полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, способом, изложенным, например, в патенте США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 или 4179337.

[00203] В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующуюся определенной гомологией или идентичностью с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, характеризующуюся определенной гомологией или идентичностью с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8. Такие варианты осуществления тяжелых/легких цепей с гомологией или идентичностью дополнительно представлены далее. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующиеся более чем 70% гомологии или идентичности с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующиеся более чем 75% гомологии или идентичности с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующиеся более чем 80% гомологии или идентичности с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующиеся более чем 85% гомологии или идентичности с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующиеся более чем 90% гомологии или идентичности с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующиеся более чем 95%

гомологии или идентичности с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующуюся любой из приведенной гомологии или идентичности с тяжелой цепью, изложенной под SEQ ID NO:7, при этом CDR (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) идентичны с CDR в тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат легкую цепь, характеризующуюся более чем 70% гомологии или идентичности с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат легкую цепь, характеризующуюся более чем 75% гомологии или идентичности с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат легкую цепь, характеризующуюся более чем 80% гомологии или идентичности с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат легкую цепь, характеризующуюся более чем 85% гомологии или идентичности с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат легкую цепь, характеризующуюся более чем 90% гомологии или идентичности с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат легкую цепь, характеризующуюся более чем 95% гомологии или идентичности с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат легкую цепь, характеризующуюся любой из приведенной гомологии или идентичности с легкой цепью, изложенной под SEQ ID NO:8, при этом CDR (CDR-L1, CDR-L2 и

CDR-L3) идентичны с CDR в легкой цепи, изложенной под SEQ ID NO:8. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат любую гомологичную легкую цепь и любую гомологичную тяжелую цепь, представленную в данном абзаце, в любой комбинации или перестановке.

[00204] В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся определенной гомологией или идентичностью с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся определенной гомологией или идентичностью с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. Такие варианты осуществления переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи с гомологией или идентичностью дополнительно представлены далее. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся более чем 70% гомологии или идентичности с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся более чем 75% гомологии или идентичности с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся более чем 80% гомологии или идентичности с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся более чем 85% гомологии или идентичности с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления

антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся более чем 90% гомологии или идентичности с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся более чем 95% гомологии или идентичности с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся любой из приведенной гомологией или идентичностью с переменным участком тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22, при этом CDR (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) идентичны с CDR в переменном участке тяжелой цепи, изложенным под SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся более чем 70% гомологии или идентичности с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся более чем 75% гомологии или идентичности с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся более чем 80% гомологии или идентичности с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся более чем 85% гомологии или идентичности с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий

фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся более чем 90% гомологии или идентичности с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся более чем 95% гомологии или идентичности с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся любой из приведенной гомологией или идентичностью с переменным участком легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23, при этом CDR (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) идентичны с CDR в переменном участке легкой цепи, изложенным под SEQ ID NO:23. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат любой гомологичный переменный участок легкой цепи и любой гомологичный переменный участок тяжелой цепи, представленный в данном абзаце, в любой комбинации или перестановке.

[00205] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4, представленное в данном документе, содержит CDR-участки тяжелой и легкой цепи антитела, обозначаемого Ha22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267, или CDR-участки тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям CDR-участков тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антитела к нектину-4, обозначаемого Ha22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267.

[00206] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4, представленное в данном документе, содержит CDR-участки (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) тяжелой и легкой цепи антитела, обозначаемого Ha22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267, или CDR-участки тяжелой и легкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, которые гомологичны аминокислотным последовательностям CDR-участков тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антитела к нектину-4, обозначаемого Ha22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267.

[00207] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок гуманизированной тяжелой цепи и переменный участок гуманизированной легкой цепи, где:

(a) переменный участок тяжелой цепи содержит CDR (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), содержащие аминокислотные последовательности изложенных CDR переменного участка тяжелой цепи в антителе, продуцируемом гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267;

(b) переменный участок легкой цепи содержит CDR (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащие аминокислотные последовательности изложенных CDR переменного участка легкой цепи в антителе, продуцируемом гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267.

[00208] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат

вариабельный участок гуманизированной тяжелой цепи и вариабельный участок гуманизированной легкой цепи, где:

(a) вариабельный участок тяжелой цепи содержит CDR (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), состоящие из аминокислотных последовательностей изложенных CDR вариабельного участка тяжелой цепи в антителе, продуцируемом гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267;

(b) вариабельный участок легкой цепи содержит CDR (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), состоящие из аминокислотных последовательностей изложенных CDR вариабельного участка легкой цепи в антителе, продуцируемом гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267.

[00209] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4, представленное в данном документе, содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепи антитела, обозначаемого Ha22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267, или вариабельные участки тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям вариабельных участков тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антитела к нектину-4, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4, представленное в данном документе, содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепи антитела, обозначаемого Ha22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267, или вариабельные участки тяжелой и легкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, которые гомологичны аминокислотным последовательностям вариабельных участков тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют

требуемые функциональные свойства антитела к нектину-4, представленного в данном документе. В качестве константного участка антитела по настоящему изобретению может быть выбран любой подкласс константного участка. В одном варианте осуществления в качестве константного участка тяжелой цепи можно применять константный участок человеческого IgG1, а в качестве константного участка легкой цепи — константный участок каппа-цепи человеческого Ig.

[00210] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4, представленное в данном документе, содержит тяжелую и легкую цепи антитела, обозначаемого Na22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267, или тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям тяжелой и легкой цепей Na22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антитела к нектину-4, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4, представленное в данном документе, содержит тяжелую и легкую цепи антитела, обозначаемого Na22-2(2,4)6.1, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № PTA-11267, или тяжелую и легкую цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, которые гомологичны аминокислотным последовательностям тяжелой и легкой цепей Na22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антитела к нектину-4, представленного в данном документе.

[00211] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, где:

(a) переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична или

идентична аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267; и

(b) переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична или идентична аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267.

[00212] В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся определенной гомологией или идентичностью с аминокислотной последовательностью переменного участка тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся определенной гомологией или идентичностью с аминокислотной последовательностью переменного участка легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. Такие варианты осуществления переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи с гомологией или идентичностью дополнительно представлены далее. В некоторых вариантах осуществления переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% гомологична или идентична аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична или идентична аминокислотной последовательности переменного

участка тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В еще одних вариантах осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична или идентична аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления вариабельный участок тяжелой цепи может быть на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичным или идентичным аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В некоторых вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% гомологична или идентична аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична или идентична аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В еще одних вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична или идентична аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи может быть на

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичным или идентичным аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат любой гомологичный переменный участок легкой цепи и любой гомологичный переменный участок тяжелой цепи, представленный в данном абзаце, в любой комбинации или перестановке.

[00213] В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где:

(a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична или идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267; и

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична или идентична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267.

[00214] В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь, характеризующуюся определенной гомологией или идентичностью с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267, и легкую цепь, характеризующуюся определенной гомологией или идентичностью с

аминокислотной последовательностью легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. Такие варианты осуществления тяжелых цепей и легких цепей с гомологией или идентичностью дополнительно представлены далее. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% гомологична или идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична или идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В еще одних вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична или идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления тяжелая цепь может быть на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% гомологична или идентична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична или

идентична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № РТА-11267. В еще одних вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична или идентична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № РТА-11267. В других вариантах осуществления легкая цепь может быть на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под регистрационным № РТА-11267. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат любую гомологичную легкую цепь и любую гомологичную тяжелую цепь, представленную в данном абзаце, в любой комбинации или перестановке.

[00215] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются со специфическим эпитопом в 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с доменом VC1 из 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с доменом VC1, но не с доменом C1C2 из 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с аминокислотными остатками с 1-го по 147-й из 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с эпитопом, расположенным в аминокислотных остатках с 1-го по 147-й из 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его

представленные в данном документе, связываются с аминокислотными остатками со 111-го по 120-й из 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с аминокислотными остатками со 121-го по 130-й из 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с аминокислотными остатками со 131-го по 140-й из 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с аминокислотными остатками со 141-го по 147-й из 191P4D12. Связывающие эпитопы определенных вариантов осуществления антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в данном документе, были определены и описаны в WO 2012/047724, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00216] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с эпитопами в 191P4D12, которые являются общими среди вариантов 191P4D12, наблюдаемых у человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с эпитопами в 191P4D12, которые являются общими среди полиморизмов 191P4D12, наблюдаемых у человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с эпитопами в 191P4D12, которые являются общими среди полиморизмов 191P4D12, наблюдаемых при различных формах рака у человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, связываются с эпитопами в 191P4D12, которые будут связывать, интернализировать, нарушать или модулировать биологическую функцию 191P4D12 или вариантов 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент, представленные в данном документе, связываются с эпитопами в 191P4D12, которые могут нарушать взаимодействие 191P4D12 с лигандами, субстратами и партнерами по связыванию.

[00217] К сконструированным антителам, представленным в данном документе, относятся антитела, в которых были произведены модификации в остатках каркасного участка в VH и/или VL (например, для улучшения свойств антитела). Как правило, такие модификации каркасного участка производят для снижения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в «обратной мутации» одного или нескольких остатков каркасного участка в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать остатки каркасного участка, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки можно выявить путем сравнения последовательностей каркасных участков антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых получено антитело. Для возвращения последовательностей каркасных участков в их конфигурацию зародышевой линии соматические мутации можно подвергнуть «обратной мутации» в последовательность зародышевой линии, например, путем сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза (например, «обратной мутации» из лейцина в метионин). Такие «подвергнутые обратной мутации» антитела также охватываются настоящим изобретением.

[00218] Другой тип модификации каркасного участка предусматривает мутацию одного или нескольких остатков в каркасном участке или даже в одном или нескольких CDR-участках с целью удаления T-клеточных эпитопов и тем самым снижения потенциальной иммуногенности антитела. Данный подход также называется «деиммунизацией» и более подробно описан Сагг и соавторами в патентной публикации США № 2003/0153043.

[00219] В дополнение или альтернативно модификациям, произведенным в каркасных участках или CDR-участках, антитела по настоящему изобретению

могут быть сконструированы так, чтобы они включали модификации в Fc-участке, как правило для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Более того, антитело к 191P4D12, представленное в данном документе, может быть подвергнуто химической модификации (например, к антителу может быть присоединен один или несколько химических фрагментов) или подвергнуто химической модификации для изменения его гликозилирования, опять же, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из данных вариантов осуществления описан более подробно ниже.

[00220] В одном варианте осуществления шарнирный участок из CH1 модифицирован таким образом, чтобы изменялось количество остатков цистеина в шарнирном участке, например, увеличивалось или уменьшалось. Данный подход дополнительно описан Vodmer и соавторами в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирном участке из CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела к 191P4D12.

[00221] В другом варианте осуществления Fc-шарнирный участок из антитела подвергают мутации для уменьшения биологического периода полужизни антитела к 191P4D12. Более конкретно, в граничный участок домена CH2-CH3 Fc-шарнирного фрагмента вводят одну или несколько аминокислотных мутаций, так чтобы у антитела было ухудшенное связывание стафилококкового белка A (SpA) по сравнению со связыванием нативного Fc-шарнирного домена SpA. Данный подход более подробно описан Ward и соавторами в патенте США № 6165745.

[00222] В другом варианте осуществления антитело к 191P4D12 модифицируют для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, мутации можно вводить так, как

описано в патенте США № 6277375, Ward. В качестве альтернативы, для увеличения биологического периода полужизни антитело можно изменить в участке CH1 или CL так, чтобы оно содержало эпитоп, связывающий с рецептором реутилизации, взятый из двух петель домена CH2 Fc-участка IgG, как описано Presta и соавторами в патенте США № 5869046 и № 6121022.

[00223] В еще одних вариантах осуществления Fc-участок изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения одной или нескольких эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из конкретных аминокислотных остатков, можно заменить на отличающийся аминокислотный остаток с тем, чтобы антитело имело измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 системы комплемента. Данный подход более подробно описан в патенте США № 5624821 и № 5648260, оба от Winter и соавторов.

[00224] Реактивность антител к 191P4D12 с родственным для 191P4D12 белком можно установить с помощью ряда хорошо известных способов, в том числе вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, ELISA и FACS-анализы с применением, при необходимости, родственных для 191P4D12 белков и клеток, экспрессирующих 191P4D12, или их экстрактов. Антитело к 191P4D12 или его фрагмент можно пометить детектируемым маркером или конъюгировать со второй молекулой. К подходящим детектируемым маркерам относятся без ограничения радиоизотоп, флуоресцентное соединение, биOLUMИнесцентное соединение, хемилумИнесцентное соединение, хелатор металлов или фермент. Более того, биспецифические антитела, специфичные к двум или более эпитопам 191P4D12, получают с помощью способов, общеизвестных из уровня техники. Гомодимерные антитела также можно получить с помощью методик сшивания, которые известны из уровня техники (например, Wolff *et al.*, Cancer Res. 53: 2560-2565).

[00225] В еще одном конкретном варианте осуществления представленное в данном документе антитело к 191P4D12 представляет собой антитело, содержащее тяжелую и легкую цепи антитела, обозначаемого Ha22-2(2,4)6.1. Тяжелая цепь Ha22-2(2,4)6.1 состоит из аминокислотной последовательности длиной в диапазоне от 20-го остатка E до 466-го остатка K последовательности под SEQ ID NO:7, а легкая цепь Ha22-2(2,4). 6.1 состоит из аминокислотной последовательности в диапазоне от 23-го остатка D до 236-го остатка C последовательности под SEQ ID NO:8.

[00226] Гибридома, продуцирующая антитело, обозначаемое Ha22-2(2,4)6.1, была отправлена (посредством Federal Express) в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC), почтовый адрес: Box 1549, Manassas, VA 20108, от 18 августа 2010 года, и зарегистрирована под регистрационным номером PTA-11267.

[00227] Дополнительные варианты осуществления антитела к нектину-4 были описаны в патенте США № 8637642 и международной заявке № PCT/US2019/056214 (публикации № WO2020/117373), при этом обе публикации настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

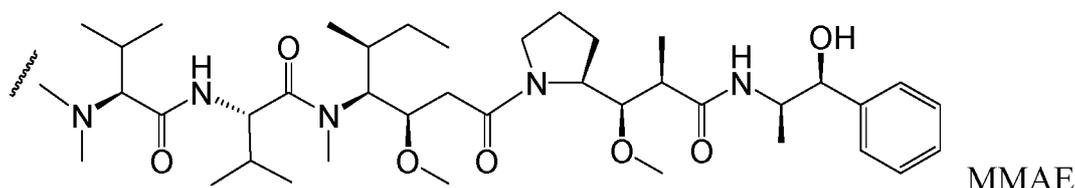
5.3.2 Цитостатики (лекарственные звенья)

[00228] Поскольку ADC, применяемый в способах, представленных в данном документе, содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с цитотоксическим средством, в настоящем изобретении дополнительно представлены различные варианты осуществления цитотоксического средства в составе ADC для применения в способах. В различных вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, в том числе способов, представленных в разделе 5.2, цитотоксическое средство в составе любого из ADC, представленных в данном документе для способов, содержит разрушающее тубулин средство, состоит из него или является им. В одном варианте осуществления цитотоксическое средство представляет собой разрушающее тубулин средство. В некоторых

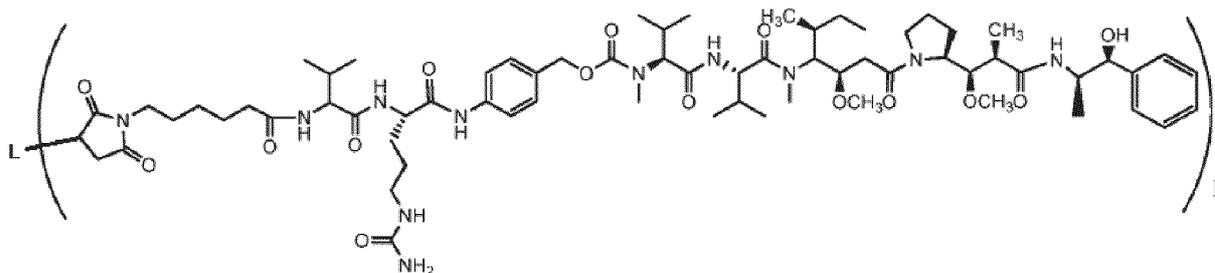
вариантах осуществления разрушающее тубулин средство выбрано из группы, состоящей из доластатина, ауристатина, гемиастерлина, алкалоида барвинка, майтанзиноида, эрибулина, колхицина, плакабулина, фомопсина, эпотилона, криптофицина и таксана. В одном конкретном варианте осуществления разрушающее тубулин средство представляет собой ауристатин. В дополнительном конкретном варианте осуществления ауристатин представляет собой монометилауристатин E (ММАЕ), монометилауристатин F (ММАF), АFР или ауристатин Т. В еще одном конкретном варианте осуществления ауристатин представляет собой монометилауристатин E (ММАЕ).

[00229] В различных вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, в том числе способов, представленных в разделе 5.2, цитотоксическое средство в составе любого из АDС, представленных в данном документе для способов, содержит любое средство, состоит из него или является им, которое выбрано из цитотоксических средств, описанных в публикации патента США № 8637642 и международной заявке № PCT/US2019/056214 (публикации № WO2020/117373), обе из которых настоящим включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00230] В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой ММАЕ (где волнистой линией указано ковалентное присоединение к линкеру из конъюгата антитела с лекарственным средством).



[00231] В некоторых вариантах осуществления иллюстративный вариант осуществления, предусматривающий ММАЕ и линкерный компонент (дополнительно описанный в данном документе), характеризуется следующей структурой (где L представляет собой антитело (например, антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент), а р варьирует от 1 до 12):



[00232] В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p варьирует от 1 до 20, от 1 до 19, от 1 до 18, от 1 до 17, от 1 до 16, от 1 до 15, от 1 до 14, от 1 до 13, от 1 до 12, от 1 до 11, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p варьирует от 2 до 20, от 2 до 19, от 2 до 18, от 2 до 17, от 2 до 16, от 2 до 15, от 2 до 14, от 2 до 13, от 2 до 12, от 2 до 11, от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p варьирует от 3 до 20, от 3 до 19, от 3 до 18, от 3 до 17, от 3 до 16, от 3 до 15, от 3 до 14, от 3 до 13, от 3 до 12, от 3 до 11, от 3 до 10, от 3 до 9, от 3 до 8, от 3 до 7, от 3 до 6, от 3 до 5 или от 3 до 4. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 3. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 4. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 3,8. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 5. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 6. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 7. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, p равно приблизительно 8. В некоторых вариантах

осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 9. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 10. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 11. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 12. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 13. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 14. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 15. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 16. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 17. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 18. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 19. В некоторых вариантах осуществления формулы, описанной в предыдущем абзаце, р равно приблизительно 20.

[00233] Как правило, пептидные лекарственные звенья можно получить путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи можно получить, например, согласно способу жидкофазного синтеза (см. E. Schröder and K. Lübke, “The Peptides”, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Лекарственные звенья ауристатины/доластатины можно получить согласно следующим способам: US 5635483, US 5780588, Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; и Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784.

[00234] Дополнительные варианты осуществления цитотоксического средства были описаны в патенте США № 8637642 и международной заявке

№ PCT/US2019/056214 (публикации № WO2020/117373), при этом обе публикации настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

5.3.3 Линкеры

[00235] Как правило, конъюгаты антитела с лекарственным средством содержат линкерное звено между лекарственным звеном (например, MMAE) и звеном на основе антитела (например, антитела к 191P4D12 или его антигенсвязывающего фрагмента). В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется при внутриклеточных условиях, так чтобы расщепление линкера высвобождало лекарственное звено от антитела во внутриклеточную среду. В еще одних вариантах осуществления линкерное звено не расщепляется, а лекарственное средство высвобождается, например, в результате разрушения антитела. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется расщепляющим средством, которое присутствует во внутриклеточной среде (например, внутри лизосомы, или эндосомы, или кавеолы). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, который расщепляется внутриклеточным пептидазным или протеазным ферментом, в том числе без ограничения лизосомальной или эндосомальной протеазой. В некоторых вариантах осуществления длина пептидильного линкера составляет по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. В других вариантах осуществления расщепляемый линкер является чувствительным к pH, т. е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, чувствительный к pH линкер гидролизуется в кислых условиях. Например, можно применять кислотолабильный линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, сложный ортоэфир, ацеталь, кеталь или тому подобное). В других вариантах осуществления линкер расщепляется в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Из уровня техники известны разнообразные дисульфидные линкеры, в том числе, например, линкеры, которые можно получить с применением SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-

(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуола), SPDB и SMPT.

[00236] «Линкерное звено» (LU) представляет собой бифункциональное соединение, которое можно применять для связывания лекарственного звена и звена на основе антитела с образованием конъюгата антитела с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления линкерное звено характеризуется следующей формулой:



где-A- представляет собой растягивающееся звено,

a равно 0 или 1,

каждое -W- независимо представляет собой аминокислотную звено,

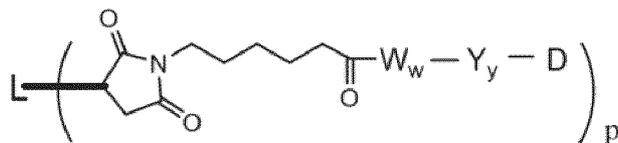
w представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 12,

-Y- представляет собой саморазрушающееся спейсерное звено, и

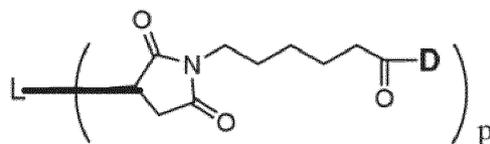
y равно 0, 1 или 2.

[00237] В некоторых вариантах осуществления a равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а y равно 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а y равно 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления, если w равно от 1 до 12, y равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления w равно от 2 до 12, а y равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a равно 1, а w и y равны 0. Линкерное звено и каждое из растягивающегося звена, аминокислотного звена и спейсерного звена были описаны в публикации патента США № 8637642 и международной заявке № PCT/US2019/056214 (публикации № WO2020/117373), обе из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

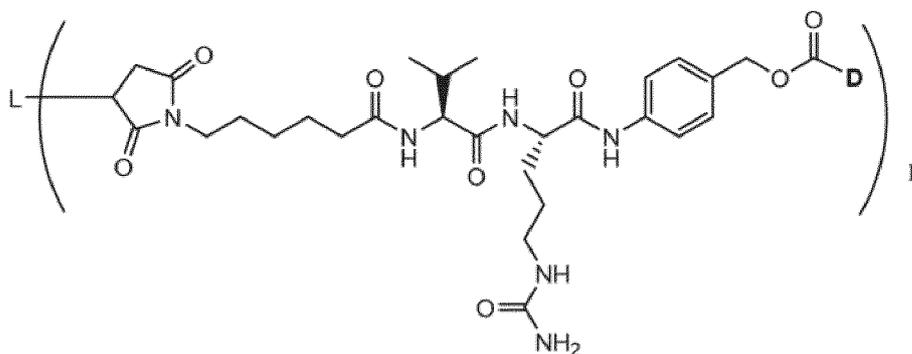
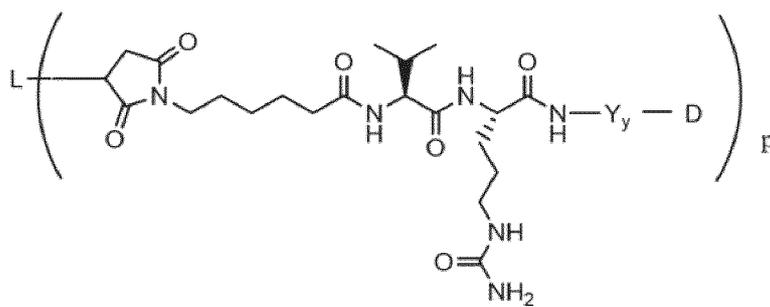
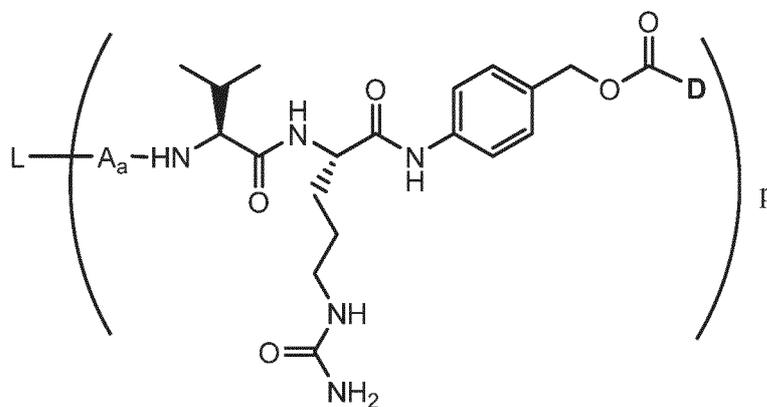
[00238] Варианты осуществления конъюгатов антитела с лекарственным средством могут включать:



где каждое из w и y равно 0, 1 или 2, и,



где каждое из w и y равно 0,



5.3.4 Содержание лекарственного средства

[00239] Содержание лекарственного средства обозначено буквой p и представляет собой среднее количество лекарственных звеньев на антитело в молекуле. Содержание лекарственного средства может варьировать от 1 до 20 лекарственных звеньев (D) на антитело. ADC, представленные в данном документе, включают коллекции антител или антигенсвязывающих фрагментов, конъюгированных с диапазоном лекарственных звеньев, например, от 1 до 20. Среднее количество лекарственных звеньев на антитело в препаратах ADC, полученных в результате реакций конъюгации, можно охарактеризовать с помощью традиционных способов, таких как масс-спектропия и ELISA-анализ. Также количественное распределение ADC можно определить по показателю p . В некоторых случаях отделение, очистку и изучение характеристик гомогенного ADC, где p представляет собой определенное значение, от ADC с другим содержанием лекарственного средства можно осуществить с помощью таких способов, как электрофорез.

[00240] В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до 20. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до 18. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до 15. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до 12. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до 10. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до 9. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до 8. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства

определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 3 до 8. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 3 до 7. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 3 до 6. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 3 до 5. В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 3 до 4.

[00241] В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, варьирует от 1 до приблизительно 8, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 3 до приблизительно 5, от приблизительно 3 до приблизительно 4, от приблизительно 3,1 до приблизительно 3,9, от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,8, от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,7, от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,6, от приблизительно 3,3 до приблизительно 3,8 или от приблизительно 3,3 до приблизительно 3,7.

[00242] В определенных вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12 или более. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 3,1, приблизительно 3,2, приблизительно 3,3, приблизительно 3,4, приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8 или приблизительно 3,9.

ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 12. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 13. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 14. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 15. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 16. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 17. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 18. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 19. В некоторых вариантах осуществления содержание лекарственного средства для ADC, представленного в данном документе, составляет приблизительно 20.

[00244] В определенных вариантах осуществления во время реакции конъюгации с антителом конъюгируется меньше теоретического максимума лекарственных звеньев. Антитело может содержать, например, остатки лизина, которые не вступают в реакцию с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом. Обычно антитела не содержат большого количества свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут быть связаны с лекарственным звеном, на самом деле, большинство тиоловых остатков цистеина в антителах существуют в виде дисульфидных мостиков. В определенных вариантах осуществления антитело можно восстановить с помощью восстановителя, такого как дитиотреитол (ДТТ) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), в условиях частичного или полного восстановления с получением реакционноспособных тиоловых групп цистеина. В определенных вариантах осуществления антитело подвергают денатурирующим условиям для выявления реакционноспособных

нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин. В некоторых вариантах осуществления линкерное звено или лекарственное звено конъюгировано через остаток лизина на звене на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления линкерное звено или лекарственное звено конъюгировано через остаток цистеина на звене на основе антитела.

[00245] В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному звену или лекарственному звену, находится в тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному звену или лекарственному звену, находится в легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному звену или лекарственному звену, находится в шарнирном участке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному звену или лекарственному звену, находится в Fc-участке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному звену или лекарственному звену, находится в константном участке (например, CH1, CH2 или CH3 тяжелой цепи или CH1 легкой цепи) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В еще одних вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному звену или лекарственному звену, находится в каркасных участках VH антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В еще одних вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному звену или лекарственному звену, находится в каркасных участках VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

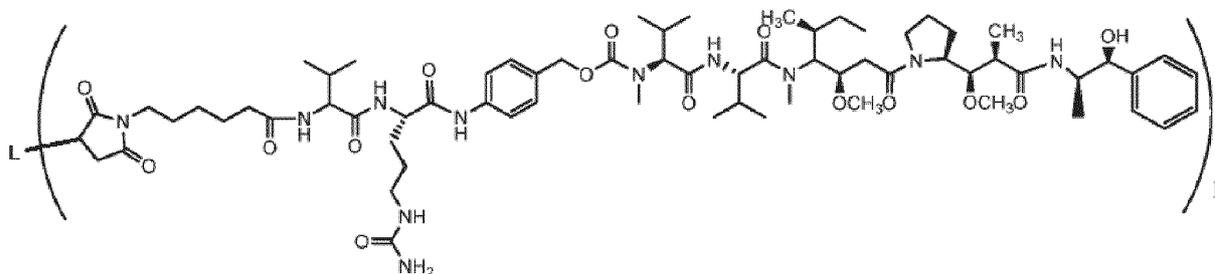
[00246] Содержание (соотношение лекарственное средство/антитело) в ADC можно контролировать различными способами, например, с помощью следующего: (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента по отношению к

антителу, (ii) ограничения времени или температуры реакции конъюгации, (iii) условий частичного или ограничивающего восстановления для модификации тиола цистеина, (iv) конструирования с помощью рекомбинантных методик аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы были модифицированы количество и положение остатков цистеина для контроля количества и/или положения точек соединений линкера с лекарственным средством (таких как тио-Mab или тио-Fab, полученные так, как раскрыто в данном документе и в WO2006/034488 (включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте)).

[00247] Следует понимать, что если в реакцию с промежуточным соединением лекарственного средства-линкера или линкерным реагентом вступает более одной нуклеофильной группы с последующей реакцией с реагентом лекарственного звена, то полученный продукт представляет собой смесь соединений ADC с распределением одного или нескольких лекарственных звеньев, присоединенных к звену на основе антитела. Среднее количество лекарственных средств на антитело можно рассчитать из смеси с помощью анализа на основе антител методом двойного ELISA, специфичного к антителу и специфичного к лекарственному средству. Отдельные молекулы ADC можно идентифицировать в смеси с помощью масс-спектропии и разделить с помощью HPLC, например, хроматографии гидрофобных взаимодействий (см., например, Hamblett, KJ, et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). В определенных вариантах осуществления гомогенный ADC с единым значением содержания можно выделить из конъюгационной смеси с помощью электрофореза или хроматографии.

[00248] Способы получения, скрининга и изучения характеристик конъюгатов антитела с лекарственным средством известны специалисту в данной области техники, например, описанные в патенте США № 8637642, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00249] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела с лекарственным средством для способов, представленных в данном документе, представляет собой AGS-22M6E, который получают в соответствии со способами, описанными в патенте США № 8637642, и он характеризуется следующей формулой:



где L представляет собой Ha22-2(2,4)6.1, а p составляет от 1 до 20.

[00250] В некоторых вариантах осуществления p варьирует от 1 до 20, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления p варьирует от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 1. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 2. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 3. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 4. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 5. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 6. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 7. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 8. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 9. В других вариантах осуществления p равно приблизительно 10. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 3,2. В некоторых

вариантах осуществления р равно приблизительно 3,3. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 3,4. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 3,5. В других вариантах осуществления р равно приблизительно 3,6. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 3,7. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 3,8. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 3,9. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,0. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,1. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,2. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,3. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,4. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,5. В других вариантах осуществления р равно приблизительно 4,6. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,7. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,8. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 4,9. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 5,0.

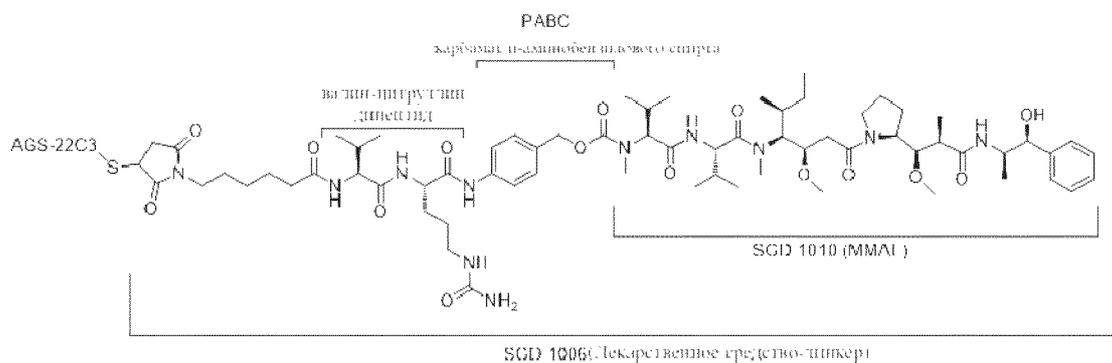
[00251] В некоторых вариантах осуществления ADC, применяемый в способах, представленных в данном документе, представляет собой энфортумаба ведотин. Энфортумаба ведотин представляет собой ADC, состоящий из полностью человеческого иммуноглобулина G1 каппа (IgG1_κ), конъюгированного с разрушающим микротрубочки средством (MMAE) посредством расщепляемого протеазой линкера (Challita-Eid PM et al, Cancer Res. 2016;76(10):3003-13]. Энфортумаба ведотин индуцирует противоопухолевую активность путем связывания с белком 191P4D12 на поверхности клетки, что приводит к интернализации комплекса ADC-191P4D12, который затем перемещается в лизосомальный компартмент, где MMAE высвобождается посредством протеолитического расщепления линкера. Внутриклеточное высвобождение MMAE впоследствии нарушает полимеризацию тубулина, что приводит к блокировке клеточного цикла в фазе G2/M и апоптотической гибели клеток (Francisco JA et al, Blood. 2003 Aug 15;102(4):1458-65).

[00252] Как описано выше и в патенте США № 8637642, AGS-22M6E представляет собой ADC, полученный из линии клеток мышины гибридомы. Энфортумаба ведотин представляет собой эквивалент ADC AGS-22M6E, полученный из линии клеток яичников китайского хомячка (CHO), и является иллюстративным продуктом, применяемым для лечения людей. Энфортумаба ведотин содержит ту же аминокислотную последовательность, линкер и цитотоксическое лекарственное средство, что и AGS-22M6E. Сопоставимость между энфортумаба ведотином и AGS-22M6E была подтверждена посредством обширных аналитических и биологических исследований характеристик, таких как аффинность связывания с 191P4D12, цитотоксичность *in vitro* и противоопухолевая активность *in vivo*.

[00253] В одном варианте осуществления ADC, представленный в данном документе, представляет собой энфортумаба ведотин, также известный как EV, PADCEV, AGS-22M6E, AGS-22C3E и AGS-22CE. Энфортумаба ведотин включает антитело к 191P4D12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую последовательность с аминокислотного остатка 20 по аминокислотный остаток 466 из последовательности под SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, содержащую последовательность с аминокислотного остатка 23 по аминокислотный остаток 236 из последовательности под SEQ ID NO:8.

[00254] Энфортумаба ведотин представляет собой конъюгат (ADC) антитела к нектину-4 с лекарственным средством, состоящий из полностью человеческого моноклонального антитела IgG1 каппа к нектину-4 (AGS-22C3), конъюгированного с низкомолекулярным разрушающим микротрубочки средством, метиллауристатином E (MMAE), посредством расщепляемого протеазой малеимидакапроил-валин-цитруллинового (vc) линкера (SGD-1006). Конъюгация происходит на остатках цистеина, которые входят в состав межцепочечных дисульфидных связей антитела, с образованием продукта с соотношением лекарственного средства к антителу, составляющим примерно 3,8:1. Молекулярный вес составляет примерно 152 кДа.

[00255] Энфортумаба ведотин характеризуется следующей структурной формулой:



[00256] К каждой молекуле антитела прикреплено примерно 4 молекулы MMAE. Энфортумаба ведотин получают путем химической конъюгации антитела и низкомолекулярных компонентов. Антитело производится клетками млекопитающих (яичников китайского хомячка), а низкомолекулярные компоненты получают путем химического синтеза.

[00257] Инъекционная форма энфортумаба ведотина представлена в виде стерильного, не содержащего консервантов, лиофилизованного порошка белого-беловатого цвета в однодозовых флаконах для внутривенного применения. Энфортумаба ведотин поставляют в дозах 20 мг на флакон и 30 мг на флакон, и для него необходимо ресуспендирование стерильной водой для инъекций, USP (2,3 мл и 3,3 мл соответственно), в результате чего образуется прозрачный или слегка опалесцирующий раствор бесцветного-желтоватого цвета с конечной концентрацией 10 мг/мл. После ресуспендирования из каждого флакона можно взять 2 мл (20 мг) и 3 мл (30 мг). Каждый мл ресуспендированного раствора содержит 10 мг энфортумаба ведотина, гистидин (1,4 мг), моногидрат гидрохлорида гистидина (2,31 мг), полисорбат 20 (0,2 мг) и дигидрат трегалозы (55 мг) с pH 6,0.

5.4 Фармацевтические композиции

[00258] В определенных вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, ADC, применяемый в способах, представлен в

«фармацевтических композициях». Такие фармацевтические композиции включают конъюгат антитела с лекарственным средством, представленный в данном документе, и одно или несколько фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых вспомогательных средств. В определенных вариантах осуществления конъюгат антитела с лекарственным средством представлен в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами или отдельно от них. Также представлена композиция, содержащая одно или несколько таких дополнительных средств и одно или несколько фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых вспомогательных средств. В отдельных вариантах осуществления конъюгат антитела с лекарственным средством и дополнительное(-ые) средство(-а) присутствуют в терапевтически приемлемом количестве. Фармацевтические композиции можно применять в соответствии со способами и вариантами применений, представленными в данном документе. Так, например, фармацевтические композиции можно вводить *ex vivo* или *in vivo* субъекту для реализации на практике способов лечения и вариантов применения, представленных в данном документе. Фармацевтические композиции, представленные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы быть совместимыми с предполагаемым способом или путем введения; иллюстративные пути введения изложены в данном документе.

[00259] В некоторых вариантах осуществления представлены фармацевтические композиции с конъюгатами антитела с лекарственным средством, которые модулируют рак или опухоль.

[00260] В определенных вариантах осуществления представленных в данном документе способов фармацевтические композиции, содержащие ADC, могут дополнительно содержать другие терапевтически активные средства или соединения, раскрываемые в данном документе или известные специалисту в данной области техники, которые можно применять при лечении или предупреждении различных заболеваний и нарушений, которые изложены в данном документе (например, рака). Как изложено выше, дополнительные

терапевтически активные средства или соединения могут присутствовать в отдельной(-ых) фармацевтической(-их) композиции(-ях).

[00261] Фармацевтические композиции, как правило, содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из конъюгатов антитела с лекарственным средством, представленных в данном документе, и одно или несколько фармацевтически приемлемых средств для приготовления состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или несколько дополнительных средств, описанных в данном документе.

[00262] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество представленного в данном документе конъюгата антитела с лекарственным средством. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[00263] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела с лекарственным средством в представленной в данном документе фармацевтической композиции выбран из конъюгатов антитела с лекарственным средством, описанных выше в разделе 5.3.

[00264] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат антитела с лекарственным средством в концентрации от 0,1 до 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат антитела с лекарственным средством в концентрации от 1 до 20 мг/мл. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат антитела с лекарственным средством в концентрации от 5 до 15 мг/мл. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат антитела с лекарственным

[00265] В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит

[00266] L-гистидин, твин-20 и по меньшей мере одно из дигидрата трегалозы или сахарозы. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция дополнительно содержит соляную кислоту (HCl) или янтарную кислоту.

[00267] В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина, пригодная в представленных в данном документе фармацевтических композициях, находится в диапазоне от 5 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях находится в диапазоне от 10 до 40 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях находится в диапазоне от 15 до 35 мМ.

[00268] В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях находится в диапазоне от 15 до 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях находится в диапазоне от 15 до 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях находится в диапазоне от 15 до 35 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 16 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 17 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 18 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-

гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 19 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 21 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 22 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 23 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 24 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в представленных в данном документе фармацевтических композициях составляет приблизительно 25 мМ.

[00269] В некоторых вариантах осуществления концентрация твина-20, пригодная в представленных в данном документе фармацевтических композициях, находится в диапазоне от 0,001 до 0,1% (объем/объем). В другом варианте осуществления концентрация твина-20 находится в диапазоне от 0,0025 до 0,075% (объем/объем). В одном варианте осуществления концентрация твина-20 находится в диапазоне от 0,005 до 0,05% (объем/объем). В другом варианте осуществления концентрация твина-20 находится в диапазоне от 0,0075 до 0,025% (объем/объем). В другом варианте осуществления концентрация твина-20 находится в диапазоне от 0,0075 до 0,05% (объем/объем). В другом варианте осуществления концентрация твина-20 находится в диапазоне от 0,01 до 0,03% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,01% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,015% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,016% (объем/объем). В

одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,017% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,018% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,019% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,02% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,021% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,022% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,023% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,024% (объем/объем). В одном отдельном варианте осуществления концентрация твина-20 составляет приблизительно 0,025% (объем/объем).

[00270] В одном варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы, пригодная в представленных в данном документе фармацевтических композициях, находится в диапазоне от 1% до 20% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы находится в диапазоне от 2% до 15% (вес/объем). В одном варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы находится в диапазоне от 3% до 10% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы находится в диапазоне от 4% до 9% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы находится в диапазоне от 4% до 8% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы находится в диапазоне от 4% до 7% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы находится в диапазоне от 4% до 6% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы находится в диапазоне от 4,5% до 6% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата трегалозы составляет приблизительно 4,6% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация дигидрата

осуществления молярность дигидрата трегалозы составляет приблизительно 155 мМ.

[00272] В одном варианте осуществления концентрация сахарозы, пригодная в представленных в данном документе фармацевтических композициях, находится в диапазоне от 1% до 20% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы находится в диапазоне от 2% до 15% (вес/объем). В одном варианте осуществления концентрация сахарозы находится в диапазоне от 3% до 10% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы находится в диапазоне от 4% до 9% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы находится в диапазоне от 4% до 8% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы находится в диапазоне от 4% до 7% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы находится в диапазоне от 4% до 6% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы находится в диапазоне от 4,5% до 6% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 4,6% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 4,7% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 4,8% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 4,9% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,0% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,1% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,2% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,3% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,4% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,5% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,6% (вес/объем). В другом варианте осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5,7% (вес/объем). В другом

сахарозы составляет приблизительно 145 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 146 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 150 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 151 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 151 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 152 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 153 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 154 мМ. В определенных вариантах осуществления молярность сахарозы составляет приблизительно 155 мМ.

[00274] В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит HCl. В других вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту.

[00275] В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,5 до 6,5. В других вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,7 до 6,3. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,7. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,8. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,9. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,1. В

некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,2. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,3.

[00276] В некоторых вариантах осуществления рН измеряют при комнатной температуре. В других вариантах осуществления рН измеряют при температуре от 15°C до 27°C. В еще одних вариантах осуществления рН измеряют при 4°C. В еще одних вариантах осуществления рН измеряют при 25°C.

[00277] В некоторых вариантах осуществления рН доводят с помощью HCl. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,5 до 6,5 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,7 до 6,3 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,7 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,8 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,9 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,0 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,1 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и

фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,2 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,3 при комнатной температуре.

[00278] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,5 до 6,5 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,7 до 6,3 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,7 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,8 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,9 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,0 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,1 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,2 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HCl, и

фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,3 при температуре от 15°C до 27°C.

[00279] В некоторых вариантах осуществления рН доводят с помощью янтарной кислоты. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,5 до 6,5 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,7 до 6,3 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,7 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,8 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,9 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,0 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,1 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,2 при комнатной температуре. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,3 при комнатной температуре.

[00280] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,5 до 6,5 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН в диапазоне от 5,7 до 6,3 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,7 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,8 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 5,9 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,0 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,1 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,2 при температуре от 15°C до 27°C. В некоторых более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит янтарную кислоту, и фармацевтическая композиция характеризуется рН приблизительно 6,3 при температуре от 15°C до 27°C.

[00281] В некоторых конкретных вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит приблизительно 20 мМ L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20 и по меньшей мере одно из приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы или

приблизительно 5% (вес/объем) сахарозы. В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция дополнительно содержит HCl или янтарную кислоту. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[00282] В некоторых конкретных вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит приблизительно 20 mM L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20, приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы и HCl. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[00283] В некоторых конкретных вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит приблизительно 20 mM L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20, приблизительно 5% (вес/объем) сахарозы и HCl. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

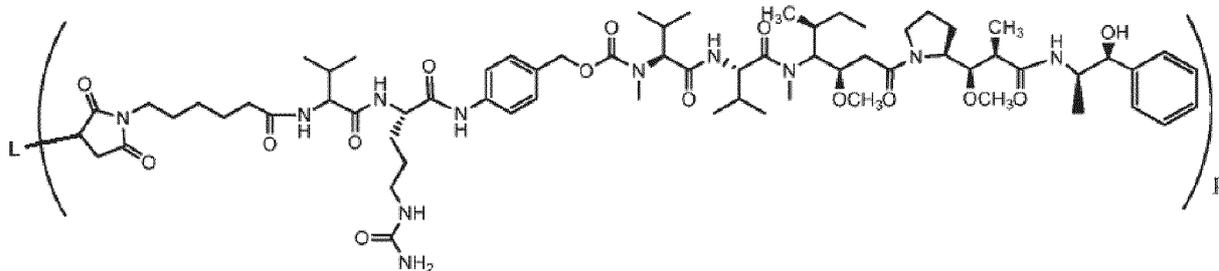
[00284] В других конкретных вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит приблизительно 20 mM L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20, приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы и янтарную кислоту. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[00285] В некоторых конкретных вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит приблизительно 20 mM L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20, приблизительно

5% (вес/объем) сахарозы и янтарную кислоту. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[00286] В конкретном варианте осуществления представленное в данном документе композиция содержит

(a) конъюгат антитела с лекарственным средством, характеризующийся следующей структурой:

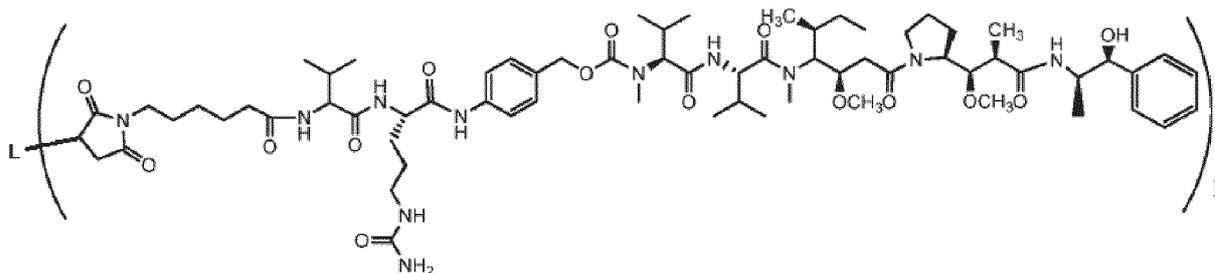


где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент), а p составляет от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемое вспомогательное средство, содержащее приблизительно 20 mM L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20, приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы и HCl, где конъюгат антитела с лекарственным средством представлен в концентрации приблизительно 10 мг/мл, и где pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[00287] В другом конкретном варианте осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит

(a) конъюгат антитела с лекарственным средством, характеризующийся следующей структурой:



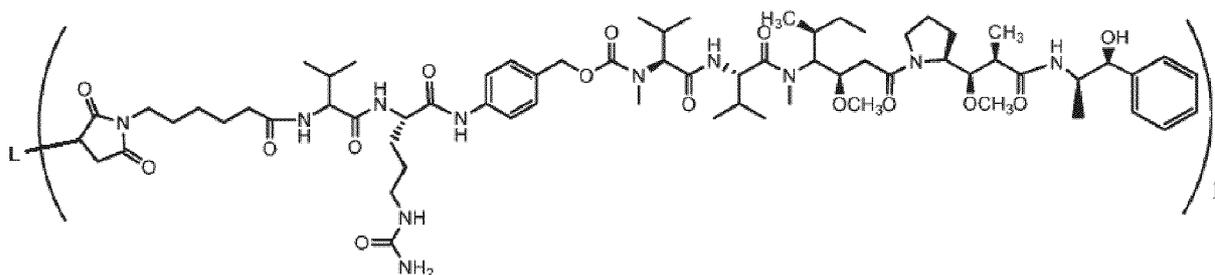
где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент), а p составляет от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемое вспомогательное средство, содержащее приблизительно 20 mM L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20, приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы и янтарную кислоту,

где конъюгат антитела с лекарственным средством представлен в концентрации приблизительно 10 мг/мл, и где pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[00288] В еще одном конкретном варианте осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция содержит

(a) конъюгат антитела с лекарственным средством, характеризующийся следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент), а p составляет от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемое вспомогательное средство, содержащее приблизительно 20 мМ L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твин-20, приблизительно 5,0% (вес/объем) сахарозы и HCl,

где конъюгат антитела с лекарственным средством представлен в концентрации приблизительно 10 мг/мл, и где pH составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

[00289] Хотя представлены определенные числа (и их числовые диапазоны), понятно, что в определенных вариантах осуществления также предусмотрены числовые значения в пределах, например, 2%, 5%, 10%, 15% или 20% от указанных чисел (или числовых диапазонов).

[00290] Первичный растворитель в среде может быть водным или неводным по своей природе. Кроме того, среда может содержать другие фармацевтически приемлемые вспомогательные средства для модификации или поддержания pH, осмолярности, вязкости, стерильности или стабильности фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая среда представляет собой водный буфер. В других вариантах осуществления среда содержит, например, хлорид натрия и/или цитрат натрия.

[00291] Представленные в данном документе фармацевтические композиции могут содержать другие фармацевтически приемлемые средства для приготовления состава для модификации или поддержания скорости высвобождения конъюгата антитела с лекарственным средством и/или дополнительного средства, которое описано в данном документе. К таким средствам для приготовления состава относятся такие вещества, которые известны специалистам в области приготовления составов с замедленным высвобождением. Дополнительную информацию, касающуюся фармацевтически и физиологически приемлемых средств для приготовления состава, см., например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) pages 1435-1712, The Merck Index, 12th Ed. (1996, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ); и Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.). Дополнительные

фармацевтические композиции, подходящие для введения, известны из уровня техники и применимы в способах и композициях, представленных в данном документе.

[00292] В некоторых вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция имеет жидкую форму. В других вариантах осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция является лиофилизированной.

[00293] Фармацевтическую композицию можно составить так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Таким образом, фармацевтические композиции включают вспомогательные средства, подходящие для введения такими путями, как парентеральный (например, подкожный (s.c.), внутривенный, внутримышечный или внутрибрюшинный), внутрикожный, пероральный (например, прием внутрь), ингаляционный, внутripолостной, внутричерепной и трансдермальный (местный). В данном документе изложены и другие иллюстративные пути введения.

[00294] Фармацевтические композиции могут быть представлены в форме стерильной инъекционной водной или маслянистой суспензии. Данную суспензию можно составить с применением подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств, раскрываемых в данном документе или известных специалисту в данной области техники. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном, приемлемом для парентерального применения разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. К приемлемым разбавителям, растворителям и дисперсионным средам, которые можно использовать, относятся вода, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, Cremophor EL™ (BASF, Парсипини, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Кроме того, в качестве

растворителя или суспендирующей среды традиционно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Более того, при приготовлении инъекционных препаратов применение находят и жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Пролонгированная абсорбция конкретных инъекционных составов может быть достигнута путем включения замедляющего абсорбцию средства (например, моностеарата алюминия или желатина).

[00295] В одном варианте осуществления представленные в данном документе фармацевтические композиции можно вводить парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации для местного или системного введения. Парентеральное введение в контексте данного документа включает внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, интраокулярное, внутрижелудочковое, внутриуретральное, внутригрудинное, внутричерепное, внутримышечное, внутрисиновиальное и подкожное введение.

[00296] В одном варианте осуществления представленные в данном документе фармацевтические композиции могут быть составлены в любых лекарственных формах, подходящих для парентерального введения, в том числе растворах, суспензиях, эмульсиях, мицеллах, липосомах, микросферах, наносистемах и твердых формах, подходящих для растворов или суспензий в жидкости перед введением инъекции. Такие лекарственные формы можно приготовить традиционными способами, известными специалистам в области фармацевтики (см., например, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, выше).

[00297] В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, предназначенные для парентерального введения, могут включать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, в том числе без ограничения водные среды, смешивающиеся с водой среды, неводные среды, противомикробные средства или консерванты против роста микроорганизмов, стабилизаторы, усилители растворимости, придающие изотоничность средства,

буферные средства, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, смачивающие или эмульгирующие средства, комплексообразователи, секвестранты или хелатирующие средства, криопротекторы, лиопротекторы, загустители, регулирующие pH средства и инертные газы.

[00298] В одном варианте осуществления к подходящим водным средам относятся без ограничения вода, солевой раствор, физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, изотонический инъекционный раствор декстрозы, инъекционная стерильная вода, инъекционный раствор декстрозы и Рингера с добавлением лактата. К неводным средам относятся без ограничения нелетучие масла растительного происхождения, касторовое масло, кукурузное масло, хлопковое масло, оливковое масло, арахисовое масло, мятное масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, соевое масло, гидрогенизированные растительные масла, гидрогенизированное соевое масло, а также среднецепочечные триглицериды кокосового масла и пальмовое масло. К смешивающимся с водой средам относятся без ограничения этанол, 1,3-бутандиол, жидкий полиэтиленгликоль (например, полиэтиленгликоль 300 и полиэтиленгликоль 400), пропиленгликоль, глицерин, *N*-метил-2-пирролидон, *N,N*-диметилацетамид и диметилсульфоксид.

[00299] В одном варианте осуществления к подходящим противомикробным средствам или консервантам относятся без ограничения фенолы, крезолы, соединения ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, метил- и пропил-*p*-гидроксибензоаты, тимеросал, хлорид бензалкония (например, хлорид бензетония), метил- и пропилпарабены и сорбиновая кислота. К подходящим придающим изотоничность средствам относятся без ограничения хлорид натрия, глицерин и декстроза. К подходящим буферным средствам относятся без ограничения фосфат и цитрат. Подходящими антиоксидантами являются описываемые в данном документе, в том числе бисульфит и метабисульфит натрия. К подходящим местным анестетикам относится без ограничения

гидрохлорид прокаина. Подходящими суспендирующими и диспергирующими средствами являются описываемые в данном документе, в том числе карбоксиметилцеллюлоза натрия, гидроксипропилметилцеллюлоза и поливинилпирролидон. К подходящим эмульгаторам относятся описываемые в данном документе, в том числе монолаурат полиоксиэтиленсорбитана, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана 80 и олеат триэтаноламина. К подходящим секвестрантам или хелатирующим средствам относится без ограничения EDTA. К подходящим регулирующим pH средствам относятся без ограничения гидроксид натрия, соляная кислота, лимонная кислота и молочная кислота. К подходящим комплексообразователям относятся без ограничения циклодекстрины, в том числе α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, гидроксипропил- β -циклодекстрин, простой сульфобутиловый эфир β -циклодекстрина и простой сульфобутиловый эфир 7- β -циклодекстрина (CAPTISOL[®], CyDex, Ленекса, Канзас).

[00300] В одном варианте осуществления представленные в данном документе фармацевтические композиции могут быть составлены для введения однократной или многократной дозировки. Составы с однократной дозировкой упаковывают в ампулу, флакон или шприц. Парентеральные составы с многократными дозировками могут содержать противомикробное средство в бактериостатических или фунгистатических концентрациях. Все парентеральные составы должны быть стерильными, что известно и реализуется на практике в данной области техники.

[00301] В одном варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде готовых к применению стерильных растворов. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде стерильных сухих растворимых продуктов, в том числе лиофилизированных порошков и таблеток для подкожного введения, которые перед применением необходимо ресуспендировать в среде. В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде готовых к применению стерильных суспензий. В еще одном варианте осуществления фармацевтические

композиции представлены в виде стерильных сухих нерастворимых продуктов, которые перед применением необходимо ресуспендировать в среде. В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде готовых к применению стерильных эмульсий.

[00302] В одном варианте осуществления представленные в данном документе фармацевтические композиции могут быть составлены в виде лекарственных форм с немедленным или модифицированным высвобождением, в том числе форм с отсроченным, замедленным, импульсным, контролируемым, направленным и программируемым высвобождением.

[00303] Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для приготовления водной суспензии путем добавления воды, представляют собой активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим средством, суспендирующим средством и одним или несколькими консервантами. В данном документе проиллюстрированы подходящие диспергирующие или смачивающие средства и суспендирующие средства.

[00304] Фармацевтические композиции также могут включать вспомогательные средства для защиты композиции от быстрого разложения или выведения из организма, такие как состав с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты, липосомы, гидрогели, пролекарства и микроинкапсулированные системы доставки. Например, можно использовать материал замедленного действия, такой как глицерилмоностеарат или глицерилстеарат, отдельно или в сочетании с воском. Пролонгированная абсорбция инъекционных фармацевтических композиций может быть достигнута путем включения средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например: парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобных.

[00305] Представленную в данном документе фармацевтическую композицию можно хранить при -80°C , 4°C , 25°C или 37°C .

[00306] Лиофилизированную композицию можно получить путем сублимационной сушки представленной в данном документе жидкой фармацевтической композиции. В конкретном варианте осуществления представленная в данном документе фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированную фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы представляют собой лиофилизированные порошки, которые можно ресуспендировать для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Их также можно ресуспендировать и составить в виде твердых веществ или гелей.

[00307] В некоторых вариантах осуществления приготовление представленного в данном документе лиофилизированного состава предусматривает порционирование составленного нерасфасованного раствора для лиофилизации, асептическую фильтрацию, наполнение флаконов, замораживание флаконов в камере сублимационной сушки с последующей лиофилизацией, укупориванием и запечатыванием.

[00308] При приготовлении лиофилизированного состава можно применять лиофилизатор. Например, можно использовать опытную установку VirTis Genesis Model EL. Установка включает камеру с тремя рабочими полками (общая полезная площадь полок около 0,4 квадратного метра), внешний конденсатор и систему механической вакуумной откачки. Каскадное механическое охлаждение позволяет охлаждать полки до -70°C или ниже, а внешний конденсатор позволяет охлаждать до -90°C или ниже. Температуру полки и давление в камере контролировали автоматически с точностью до $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и ± 2 микрона (milliTorr) соответственно. Установка была оснащена емкостным манометром-вакуумметром, вакуумметром Пирани, датчиком давления (для измерения от 0 до 1 атмосферы) и датчиком относительной влажности.

[00309] Лиофилизированный порошок можно получить путем растворения конъюгата антитела с лекарственным средством, представленного в данном документе, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. В результате последующего стерилизующего фильтрования раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, получают требуемый состав. В одном варианте осуществления полученный раствор будут распределять по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз конъюгата антитела с лекарственным средством. Лиофилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, таких как при температуре от приблизительно 4°C до комнатной температуры.

[00310] В результате ресуспендирования такого лиофилизованного порошка водой для инъекции получают состав для применения при парентеральном введении. Для ресуспендирования лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другое подходящее вспомогательное средство. Такое количество может быть определено эмпирически и скорректировано в соответствии с конкретными потребностями.

[00311] Ниже проиллюстрирована примерная процедура ресуспендирования: (1) прикрепите к шприцу емкостью 5 мл или 3 мл иглу калибра 18 или 20 и наполните шприц водой категории «Вода для инъекции» (WFI); (2) отмерьте необходимое количество WFI, используя градуировку шприца, следя за тем, чтобы в шприце не было пузырьков воздуха; (3) вставьте иглу через резиновую пробку; (4) перенесите все содержимое шприца в емкость по стенке флакона, удалите шприц и иглу и поместите их в контейнер для сбора иголок и отработанных медицинских емкостей; (4) непрерывно вращайте флакон для тщательного растворения всего содержимого флакона до полного его ресуспендирования (например, приблизительно 20-40 секунд) и минимизируйте чрезмерное перемешивание белкового раствора, которое может привести к пенообразованию.

[00312] В некоторых вариантах осуществления представленную в данном документе фармацевтическую композицию поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытой емкости, и ее можно ресуспендировать, например, водой или солевым раствором до соответствующей концентрации для введения субъекту. В определенных вариантах осуществления конъюгат антитела с лекарственным средством поставляют в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытой емкости в единичной дозировке, составляющей по меньшей мере 0,1 мг, по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 2 мг, по меньшей мере 3 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 30 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 60 мг, по меньшей мере 75 мг, по меньшей мере 80 мг, по меньшей мере 85 мг, по меньшей мере 90 мг, по меньшей мере 95 мг или по меньшей мере 100 мг. Лиофилизированный конъюгат антитела с лекарственным средством можно хранить при температуре от 2 до 8°C в оригинальной емкости, а конъюгат антитела с лекарственным средством можно вводить в течение 12 часов, таких как в течение 6 часов, в течение 5 часов, в течение 3 часов или в течение 1 часа после ресуспендирования. В альтернативном варианте осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, поставляют в жидкой форме в герметично закрытой емкости с указанием количества и концентрации конъюгата антитела с лекарственным средством. В определенных вариантах осуществления жидкую форму конъюгата антитела с лекарственным средством поставляют в герметично закрытой емкости в концентрации по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 30 мг/мл, по меньшей мере 40 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 60 мг/мл, по меньшей мере 70 мг/мл,

по меньшей мере 80 мг/мл, по меньшей мере 90 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл.

[00313] Дополнительные варианты осуществления для фармацевтических композиций были описаны в патенте США № 8637642 и международной заявке № PCT/US2019/056214 (публикации № WO2020/117373), при этом обе публикации настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

5.5 Способы комбинированной терапии

[00314] Способ ингибирования роста опухолевых клеток с применением представленной в данном документе фармацевтической композиции можно применять в комбинации с химиотерапией или лучевой терапией или с обеими, при этом способ предусматривает введение настоящей фармацевтической композиции до, во время или после начала химиотерапии или лучевой терапии, а также любой их комбинации (т. е. до и во время, до и после, во время и после или до, во время и после начала химиотерапии и/или лучевой терапии). В зависимости от протокола лечения и конкретных потребностей пациента способ реализуют таким образом, чтобы обеспечить наиболее эффективное лечение и в конечном итоге продлить жизнь пациента. Дополнительные варианты осуществления для такой комбинированной терапии были описаны в патенте США № 8637642 и международной заявке № PCT/US2019/056214 (публикации № WO2020/117373), при этом обе публикации настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

5.6 Дозировка ADC для способов

[00315] В некоторых вариантах осуществления количество профилактического или терапевтического средства (например, представленного в данном документе конъюгата антитела с лекарственным средством) или представленной в данном документе фармацевтической композиции, которое будет эффективным при предупреждении и/или лечении рака, можно определить с помощью стандартных клинических методик. В некоторых вариантах осуществления

эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривых зависимости дозы от эффекта, полученных на тест-системах в условиях *in vitro* или на тест-системах с использованием модельных животных. Следует понимать, что точная доза, которую следует использовать в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности рака у субъекта и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента.

[00316] В некоторых вариантах осуществления ADC из способов, для которых в данном разделе (разделе 5.6) описаны различные дозировки, представляет собой энфортумаба ведотин (EV).

[00317] В некоторых вариантах осуществления путь введения пациенту дозы конъюгата антитела с лекарственным средством, составленным в представленную в данном документе фармацевтическую композицию, является интраназальным, внутримышечным, внутривенным, внутривезикулярным или их комбинацией, но также приемлемы и другие описанные в данном документе пути. Каждую дозу можно вводить или не вводить одинаковым путем введения. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела с лекарственным средством, составленный в представленную в данном документе фармацевтическую композицию, можно вводить несколькими путями введения одновременно или последовательно с другими дозами одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно.

[00318] В случае фармацевтической композиции, содержащей представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, эффективное количество ADC представляет собой дозу от приблизительно 10 мг до приблизительно 1000 мг с объемом инстиляции от приблизительно 10 мл до приблизительно 100 мл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ADC представляет собой дозу от приблизительно 125 мг до

составляющую 600 мг, с объемом инстилляций, составляющим 50 мл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую 650 мг, с объемом инстилляций, составляющим 50 мл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую 700 мг, с объемом инстилляций, составляющим 50 мл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую 750 мг, с объемом инстилляций, составляющим 50 мл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую 800 мг, с объемом инстилляций, составляющим 50 мл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую 850 мг, с объемом инстилляций, составляющим 50 мл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую 900 мг, с объемом инстилляций, составляющим 50 мл.

[00342] В некоторых вариантах осуществления максимальное время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 120 минут. В некоторых вариантах осуществления максимальное время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 90 минут. В некоторых вариантах осуществления максимальное время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения представляет собой время пребывания в организме, переносимое субъектом. В некоторых вариантах осуществления время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет от приблизительно 30 минут до приблизительно 120 минут. В некоторых вариантах осуществления время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет от приблизительно 30 минут до приблизительно 90 минут. В некоторых вариантах осуществления время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 40 минут. В

организме после каждого внутривезикулярного введения составляет 110 минут. В некоторых вариантах осуществления время пребывания в организме после каждого внутривезикулярного введения составляет 120 минут.

[00343] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно в течение фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно в течение фазы поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно в течение двух фаз, где две фазы представляют собой фазу индукции и фазу поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления фаза поддержания дозы начинается после фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель, в период от шести до девяти недель или в период от шести до восьми недель после фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фаза поддержания дозы начинается через десять недель после фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фаза поддержания дозы начинается через девять недель после фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фаза поддержания дозы начинается через восемь недель после фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фаза поддержания дозы начинается через семь недель после фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фаза поддержания дозы начинается через восемь недель после фазы индукции.

[00344] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят от приблизительно 1 до приблизительно 25 раз, где дозы можно вводить по мере необходимости, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, раз в

три месяца и т. д., как определит врач. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят еженедельно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят ежемесячно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят раз в два месяца. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят раз в три месяца. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят 25 раз, 24 раза, 23 раза, 22 раза, 21 раз, 20 раз, 19 раз, 18 раз, 17 раз, 16 раз, 15 раз, 14 раз, 13 раз, 12 раз, 11 раз, 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза или 1 раз для лечения NMIBC, где доза составляет от приблизительно 10 мг до приблизительно 1000 мг с объемом инстилляций от приблизительно 10 мл до приблизительно 100 мл.

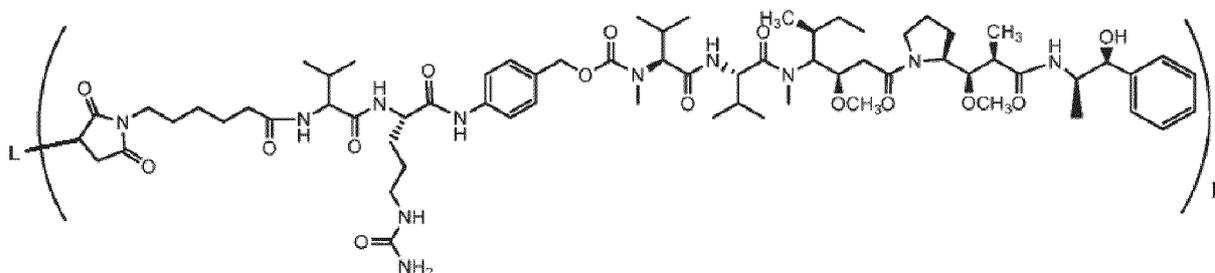
[00345] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутрипузырно один раз в неделю в течение четырех недель во время фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутрипузырно один раз в неделю в течение пяти недель во время фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутрипузырно один раз в неделю

в течение шести недель во время фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в неделю в течение семи недель во время фазы индукции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в неделю в течение восьми недель во время фазы индукции.

[00346] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в месяц в течение шести месяцев во время фазы поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в месяц в течение семи месяцев во время фазы поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в месяц в течение восьми месяцев во время фазы поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в месяц в течение десяти месяцев во время фазы поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривезикулярно один раз в месяц в течение 11 месяцев во время фазы поддержания дозы.

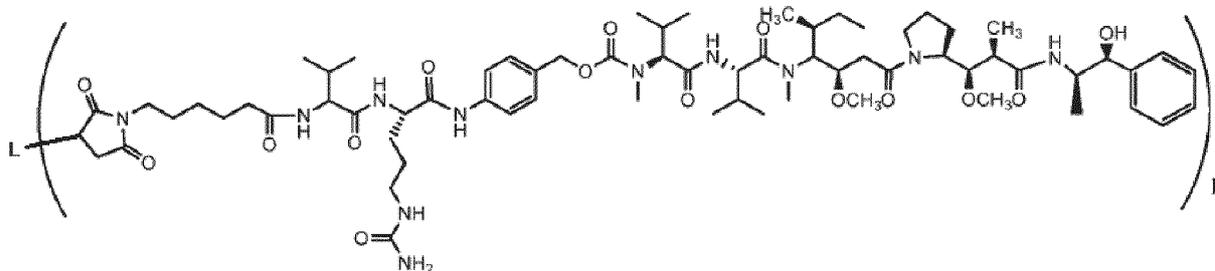
[00347] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую представленный в данном документе конъюгат антитела с лекарственным средством, вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель или от шести до восьми недель после фазы индукции.

[00348] В некоторых более конкретных вариантах осуществления представленных в данном документе способов ADC характеризуется следующей структурой:



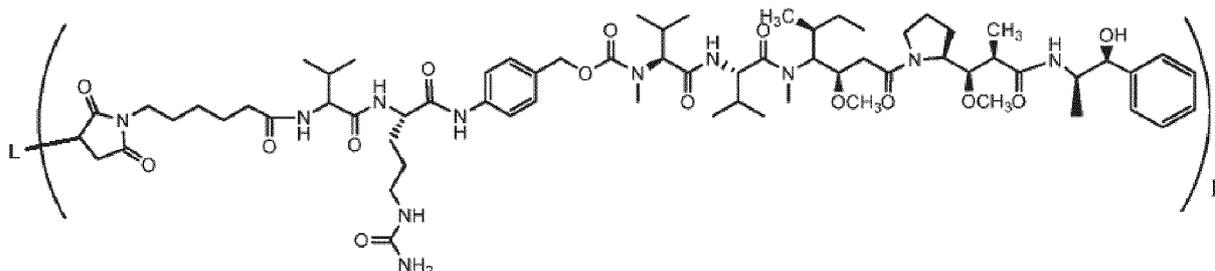
где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 125 мг, с объемом инстилляцией, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

[00349] В некоторых более конкретных вариантах осуществления представленных в данном документе способов ADC характеризуется следующей структурой:



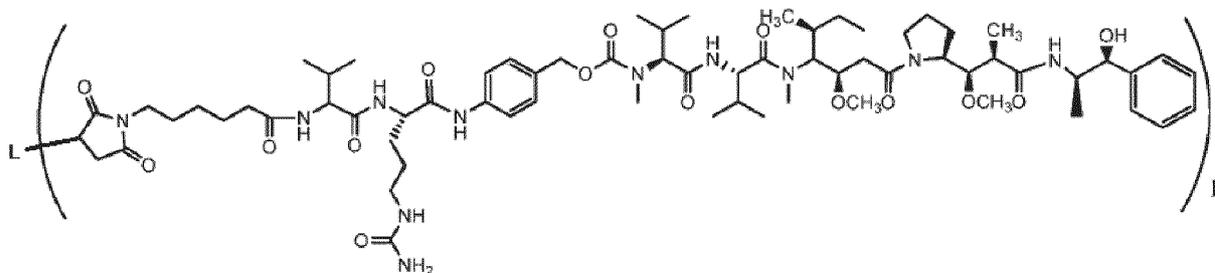
где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 250 мг, с объемом инстилляции, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

[00350] В некоторых более конкретных вариантах осуществления представленных в данном документе способов ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 500 мг, с объемом инстилляцией, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

[00351] В некоторых более конкретных вариантах осуществления представленных в данном документе способов ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а r равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 750 мг, с объемом инстиляции, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

5.7 Способы определения биомаркеров

[00352] В настоящем изобретении представлено, что экспрессию любого из представленных в данном документе маркеров можно определить различными способами, известными из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления экспрессию маркеров можно определить по количеству или относительному количеству мРНК, транскрибируемой с маркерных генов. В одном варианте осуществления экспрессию маркерных генов можно определить по количеству или относительному количеству белковых продуктов, кодируемых маркерными генами. В другом варианте осуществления экспрессию маркерных генов можно определять по уровню биологического или химического ответа, индуцированного белковыми продуктами, кодируемыми маркерными генами. Кроме того, в определенных вариантах осуществления экспрессию маркерных генов можно определить по экспрессии одного или нескольких генов, которая коррелирует с экспрессией маркерных генов.

[00353] Как описано выше, уровни или количества генных транскриптов (например, мРНК) маркерных генов можно применять в качестве заменителя показателя уровней экспрессии маркерных генов. Из уровня техники известны многочисленные различные протоколы ПЦР или qPCR, в том числе проиллюстрированные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления для определения уровня мРНК различных маркерных генов применяют или адаптируют различные способы ПЦР или qPCR. В некоторых вариантах осуществления применяют и адаптируют количественную ПЦР (qPCR) (также называемую ПЦР в режиме реального времени), поскольку она обеспечивает не только количественное измерение, но также и сокращает время и загрязнение. Используемый в данном документе термин «количественная ПЦР» (или «qPCR») относится к прямому отслеживанию прогресса ПЦР-амплификации, поскольку она происходит без необходимости повторного отбора образцов продуктов реакции. При количественной ПЦР продукты реакции можно отслеживать с помощью сигнального механизма (например, флуоресценции) по мере их образования и следить за ними после того, как сигнал превысит фоновый уровень, но до того, как реакция достигнет плато. Количество циклов, необходимых для достижения детектируемого или «порогового» уровня флуоресценции, напрямую зависит от концентрации амплифицированных целевых молекул в начале процесса ПЦР, что позволяет измерить интенсивность сигнала для получения показателя количества целевой нуклеиновой кислоты в образце в режиме реального времени. При применении qPCR для определения уровня экспрессии мРНК перед анализом qPCR проводят дополнительную стадию обратной транскрипции мРНК в ДНК. Примеры способов ПЦР можно найти в литературе (Wong et al., *BioTechniques* 39:75-85 (2005); D'haene et al., *Methods* 50:262-270 (2010)), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Примеры ПЦР-анализов также можно найти в патенте США № 6927024, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Примеры способов RT-PCR также можно найти в патенте США № 7122799, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способ флуоресцентной

ПЦР *in situ* описан в патенте США № 7186507, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00354] В одном конкретном варианте осуществления qPCR для определения или измерения уровней мРНК маркерных генов можно провести так, как описано далее. Вкратце: определяют средние значения Ct (порог цикла) (или взаимозаменяемо называемые в данном документе Cq (цикл количественной оценки)) повторных реакций qPCR для маркерных генов и одного или нескольких конститутивных генов. Средние значения Ct для маркерных генов затем можно нормализовать к значениям Ct конститутивных генов с помощью следующей иллюстративной формулы: ΔCt маркерного гена = (среднее значение Ct маркерного гена - среднее значение Ct конститутивного гена A). Относительное значение ΔCt маркерного гена затем можно использовать для определения относительного уровня мРНК маркерного гена, например, с помощью формулы: экспрессия мРНК = $2^{-\Delta Ct}$. Сводную информацию о значениях Ct и Cq см. в руководствах MIQE (Bustin et al., The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clinical Chemistry* 55:4 (2009)).

[00355] Для количественной оценки РНК-транскриптов маркерных генов в образце в качестве заменителя показателя экспрессии маркерных генов также можно применять и другие широко применяемые способы, известные из уровня техники, в том числе нозерн-блоттинг и гибридизацию *in situ* (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)), анализы защиты от РНКаз (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)), микрочипы (Hoheisel et al., *Nature Reviews Genetics* 7:200-210 (2006); Jaluria et al., *Microbial Cell Factories* 6:4 (2007)) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (Weis et al, *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)). Гибридизация РНК *in situ* (ISH) представляет собой молекулярно-биологическую методику, широко применяемую для измерения и локализации конкретных последовательностей РНК, например, матричных РНК (мРНК), длинных некодирующих РНК (lncRNA) и микроРНК (miRNA) внутри клеток, таких как циркулирующие опухолевые клетки (СТС) или срезы тканей,

при сохранении клеточного и тканевого контекста. ISH представляет собой такой тип гибридизации, при котором прямо или опосредованно применяют меченную комплементарную цепь ДНК или РНК, такую как зонд, для связывания и локализации конкретной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, в образце, в частности в его части или участке ткани или клеток (*in situ*). Типы зондов могут представлять собой двухцепочечную ДНК (dsDNA), одноцепочечную ДНК (ssDNA), одноцепочечную комплементарную РНК (sscRNA), матричную РНК (мРНК), микроРНК (miRNA), рибосомальную РНК, митохондриальную РНК и/или синтетические олигонуклеотиды. Термин «флуоресцентная гибридизация *in situ*» или «FISH» относится к типу ISH с использованием флуоресцентной метки. Термин «хромогенная гибридизация *in situ*» или «CISH» относится к типу ISH с хромогенной меткой. Способы ISH, FISH и CISH хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, Stoler, *Clinics in Laboratory Medicine* 10(1):215-236 (1990); *In situ hybridization. A practical approach*, Wilkinson, ed., IRL Press, Oxford (1992); Schwarzscher and Heslop-Harrison, *Practical in situ hybridization*, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford (2000)). Таким образом, ISH РНК обеспечивает пространственно-временную визуализацию, а также количественную оценку экспрессии генов в клетках и тканях. Она имеет широкое применение в исследованиях и в диагностике (Hu et al., *Biomark. Res.* 2(1):1-13, doi: 10.1186/2050-7771-2-3 (2014); Ratan et al., *Cureus* 9(6):e1325. doi: 10.7759/cureus.1325 (2017); Weier et al., *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2(2):109-119 (2002)). Флуоресцентная ISH РНК предусматривает использование флуоресцентных красителей и флуоресцентных микроскопов для мечения и детекции РНК соответственно. Флуоресцентная ISH РНК может обеспечить мультиплексирование четырех-пяти целевых последовательностей.

[00356] В качестве альтернативы РНК-транскрипты маркерных генов в образце в качестве заменителя показателя экспрессии маркерных генов можно определить с помощью методик секвенирования. К репрезентативным способам анализа экспрессии генов на основе секвенирования относятся

последовательный анализ экспрессии генов (SAGE) и анализ экспрессии генов с помощью массивно-параллельного опознавательного секвенирования (MPSS).

[00357] В некоторых вариантах осуществления экспрессию маркерных генов можно определить по относительному содержанию РНК-транскриптов (в том числе, например, мРНК) маркерных генов в пуле общей транскрибированной РНК. Такое относительное содержание РНК-транскриптов маркерных генов можно определить с помощью секвенирования следующего поколения, известного как РНК-секвенирование. В одном примере процедуры РНК-секвенирования молекулы РНК из разных источников (крови, ткани, клеток) очищают, необязательно обогащают их по содержанию (например, с помощью олиго(dT)-праймеров), преобразовывают в кДНК и фрагментируют. Из случайно фрагментированной библиотеки кДНК получают миллионы или даже миллиарды считываний коротких последовательностей. См. Zhao *et al. BMC genomics* 16: 97 (2015); Zhao *et al. Scientific Reports* 8: 4781 (2018); Shanrong Zhao *et al., RNA*, досрочно опубликована 13 апреля 2020 года, doi: 10.1261/rna.074922.120, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Уровень экспрессии каждого мРНК-транскрипта маркерных генов определяют по общему количеству картированных фрагментов при нормализации, которое прямо пропорционально уровню его содержания. Для облегчения применения содержания РНК-транскриптов в качестве параметра для определения экспрессии генов известно и применяется несколько схем нормализации, в том числе RPKM (число прочтений на тысячу нуклеотидов на миллион картированных прочтений), FPKM (число фрагментов на тысячу нуклеотидов на миллион картированных прочтений) и/или TPM (число транскриптов на тысячу нуклеотидов на миллион картированных прочтений). Вкратце: RPKM можно рассчитать следующим образом: подсчитайте общее количество прочтений в образце и разделите это число на 1000000 - это коэффициент масштабирования «на миллион», разделите количество прочтений на коэффициент масштабирования «на миллион», который нормализует глубину секвенирования и дает число прочтений на миллион (RPM), и разделите значения RPM на длину гена в тысячах

нуклеотидов, что дает RPKM. FPKM тесно связан с RPKM, за исключением того, что прочтение заменяет на фрагмент. RPKM был создан для одноконцевого РНК-секвенирования, где каждое прочтение соответствовало одному секвенируемому фрагменту. FPKM был создан для РНК-секвенирования с парными концами, в котором два прочтения могут соответствовать одному фрагменту, или, если одно прочтение в паре не было картировано, одно прочтение может соответствовать одному фрагменту. TPM очень похож на RPKM и FPKM и рассчитывается следующим образом: разделите количество прочтений на длину каждого гена в тысячах нуклеотидов, что дает количество прочтений на тысячу нуклеотидов (RPK), подсчитайте все значения RPK в образце и разделите это число на 1000000, что дает коэффициент масштабирования «на миллион», разделите значения RPK на коэффициент масштабирования «на миллион», что дает TPM. См. Zhao *et al. BMC genomics* 16: 97 (2015); Zhao *et al. Scientific Reports* 8: 4781 (2018); Shanrong Zhao *et al.*, RNA, досрочно опубликована 13 апреля 2020 года, doi: 10.1261/tma.074922.120, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00358] В одном варианте осуществления экспрессию маркерных генов определяют с помощью РНК-секвенирования, например, с помощью TPM, RPKM и/или FPKM. В некоторых вариантах осуществления экспрессию маркерных генов определяют с помощью TPM. В некоторых вариантах осуществления экспрессию маркерных генов определяют с помощью RPKM. В некоторых вариантах осуществления экспрессию маркерных генов определяют с помощью FPKM.

[00359] Как описано ранее, экспрессию маркерных генов можно определить в образце, полученном от субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови, образец сыворотки крови, образец плазмы крови, жидкость организма (например, тканевую жидкость, в том числе жидкость раковой ткани) или ткань (например, раковую ткань или ткань, окружающую раковую опухоль). В некоторых вариантах осуществления образец

представляет собой образец ткани. В некоторых вариантах осуществления образец ткани представляет собой фракции ткани, выделенные или экстрагированные из млекопитающего, в частности человека. В некоторых вариантах осуществления образец ткани представляет собой популяцию клеток, выделенную или экстрагированную из млекопитающего, в частности человека. В некоторых вариантах осуществления образец ткани представляет собой образец, полученный в результате биопсии. В определенных вариантах осуществления образцы можно получить из ряда органов субъекта, в том числе субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления образцы получают из органов больного раком субъекта. В некоторых вариантах осуществления образцы получают из пораженных раком органов у больного раком субъекта. В других вариантах осуществления образцы, например эталонные образцы, получают из нормальных органов от пациента или второго субъекта-человека.

[00360] В определенных вариантах осуществления представленных в данном документе способов к ткани относится ткань мочевого пузыря, мочеточника, молочной железы, легкого, толстой кишки, прямой кишки, яичника, фаллопиевой трубы, пищевода, шейки матки, эндометрия матки, кожи, гортани, костного мозга, слюнной железы, почки, предстательной железы, головного мозга, спинного мозга, плаценты, надпочечника, поджелудочной железы, паращитовидной железы, гипофиза, яичка, щитовидной железы, селезенки, миндалин, тимуса, сердца, желудка, тонкого кишечника, печени, скелетной мышцы, периферического нерва, мезотелия или глаза.

[00361] В дополнительных вариантах осуществления представленных в данном документе способов экспрессию различных маркерных генов можно детектировать с помощью различных иммуноанализов, известных из уровня техники, в том числе иммуногистохимического анализа (ИНС), иммуноблоттинга, FACS-анализа и ELISA.

[00362] Экспрессию различных маркерных генов можно детектировать с помощью антител к белковым продуктам, кодируемым маркерными генами, в

различных ИНС-анализах. Было продемонстрировано, что ИНС-окрашивание срезов тканей является надежным способом оценки или детектирования присутствия белков в образце. Методики ИНС предусматривают использование антитела для зондирования и визуализации клеточных антигенов *in situ*, обычно хромогенными или флуоресцентными способами. Для детекции экспрессии маркерных генов в ИНС-анализе можно применять первичные антитела или антисыворотки, такие как поликлональные антисыворотки и моноклональные антитела, которые специфически нацелены на белковые продукты, кодируемые маркерными генами. В некоторых вариантах осуществления образец ткани вводят в контакт с первичным антителом к конкретной целевой молекуле на период времени, достаточный для того, чтобы произошло связывание антитела с целевой молекулой. Как подробно рассмотрено ранее, антитела можно детектировать с помощью прямых меток на самих антителах, например, радиоактивных меток, флуоресцентных меток, гаптенных меток, таких как биотин, или фермента, такого как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. В качестве альтернативы немеченное первичное антитело применяют в сочетании с меченым вторичным антителом, представляющим собой антисыворотку, поликлональную антисыворотку или моноклональное антитело, специфичное к первичному антителу. Протоколы и наборы для ИНС хорошо известны в данной области техники и доступны на коммерческой основе. Автоматизированные системы для подготовки препаратов и ИНС-обработки доступны на коммерческой основе. Примером такой автоматизированной системы является система для окрашивания Leica BOND Autostainer и для детекции Leica Bond Refine Detection.

[00363] В некоторых вариантах осуществления ИНС-анализ проводят с использованием немеченного первичного антитела в сочетании с меченым вторичным антителом в непрямом анализе. Непрямой анализ предусматривает использование двух антител для детекции белковых продуктов, кодируемых маркерными генами, в образце ткани. Сначала на ткань (первый слой) наносили неконъюгированное первичное антитело, которое вступает в реакцию с целевым антигеном в образце ткани. Затем наносят меченное ферментом вторичное

антитело, которое специфически распознает изотип антитела первичного антитела (второй слой). Дают вторичному антителу прореагировать с первичным антителом с последующим нанесением субстрата-хромогена. Антитело второго слоя может быть помечено таким ферментом, как пероксидаза, который вступает в реакцию с хромогеном 3,3'-диаминобензидином (DAB) с образованием коричневого осадка в месте реакции. Данный способ чувствителен и универсален благодаря возможности усиления сигнала с помощью системы усиления сигнала.

[00364] В определенных вариантах осуществления для повышения чувствительности детекции можно применять систему усиления сигнала. «Система усиления сигнала» в данном документе означает систему реагентов и способов, которые можно применять для увеличения сигнала в результате детекции связанного первичного или вторичного антитела. Система усиления сигнала увеличивает чувствительность детекции целевого белка, увеличивает детектируемый сигнал и уменьшает нижнюю границу пределов детекции. Существует несколько типов систем усиления сигнала, в том числе система ферментативного мечения и система макромечения. Данные системы/подходы не являются взаимоисключающими, и их можно применять в комбинации для достижения аддитивного эффекта.

[00365] Макрометки или система макромечения представляют собой коллекции меток, насчитывающие от десятков (например, фикобилипротеины) до миллионов (например, флуоресцентные микросферы), прикрепленных к общему каркасу или включенных в него. Каркас может быть соединен с аффинным реагентом, специфичным к целевой молекуле, таким как антитело, и, как следствие, при связывании включенные метки совместно связываются с целевой молекулой. Метки в макрометках могут быть любыми из описанных в данном документе меток, такими как флуорофоры, гаптены, ферменты и/или радиоизотопы. В одном варианте осуществления в системах усиления сигнала применяли вторичное антитело, конъюгированное с полимером с меченной цепью. В данной технологии с полимером была использована меченная HRP-

ферментом инертная «остовная» молекула декстрана, к которой можно присоединить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 50 или более молекул вторичных антител, что делает систему еще более чувствительной.

[00366] В системе усиления сигнала, основанной на системе ферментного мечения, используют каталитическую активность ферментов, таких как пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфатаза, для создания высокой плотности мечения целевого белка или последовательности нуклеиновой кислоты в условиях *in situ*. В одном варианте осуществления для увеличения сигнала HRP можно применять тирамид. В такой системе HRP ферментативно превращает меченное производное тирамида в высокорекреакционноспособные короткоживущие тирамидные радикалы. Меченые активные тирамидные радикалы затем ковалентно связываются с остатками (в основном с фенольным фрагментом тирозиновых остатков белка) вблизи сайта взаимодействия HRP-антитело-целевая молекула, что приводит к увеличению количества меток в данном сайте с минимальной связанной с диффузией потерей локализации сигнала. Следовательно, сигнал можно усилить в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75 или 100 раз. Как известно специалисту в данной области техники, метки на тирамиде могут представлять собой любые метки, описанные в данном документе, в том числе флуорофоры, ферменты, гаптены, радиоизотопы и/или фотофоры. Для создания усиления сигнала также можно использовать другие ферментативные реакции. Например, для щелочной фосфатазы доступно усиление сигнала с помощью флуоресцентных белков (ELF), при котором щелочная фосфатаза ферментативно расщепляет слабосиний флуоресцентный субстрат (фосфат ELF 97) и превращает его в яркий желто-зеленый флуоресцентный осадок, который проявляет необычно большой стоксов сдвиг и отличную фотостабильность. Как система усиления сигнала на основе тирамида, так и система усиления сигнала с помощью ELF доступны на коммерческой основе, например, от ThermoFisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США 02451).

[00367] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представленных в данном документе способов уровень экспрессии маркерных генов детектируют с помощью ИНС с применением системы усиления сигнала. В некоторых вариантах осуществления образец затем подвергают контрастному окрашиванию для идентификации клеточных и субклеточных элементов.

[00368] В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белковых продуктов, кодируемых маркерными генами, также можно детектировать с помощью антител к белковым продуктам, кодируемым маркерными генами, с помощью иммуноблоттинга. В некоторых вариантах осуществления иммуноблоттинга белки зачастую (но не обязательно) разделяют с помощью электрофореза и переносят на мембраны (обычно нитроцеллюлозные или PVDF-мембраны). Аналогично ИНС-анализам, для детекции экспрессии маркерных генов можно применять первичные антитела или антисыворотки, такие как поликлональные антисыворотки и моноклональные антитела, которые специфически нацелены на белковые продукты, кодируемые маркерными генами. В некоторых вариантах осуществления мембрану вводят в контакт с первичным антителом к конкретной целевой молекуле на период времени, достаточный для того, чтобы произошло связывание антитела с антигеном, а связанные антитела можно детектировать с помощью прямых меток на самих первичных антителах, например, с помощью радиоактивных меток, флуоресцентных меток, гаптеновых меток, таких как биотин, или ферментов, таких как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. В других вариантах осуществления немеченное первичное антитело применяют в непрямом анализе, как описано выше, в сочетании с меченым вторичным антителом, специфичным к первичному антителу. Как описано в данном документе, вторичные антитела могут быть помечены, например, ферментами или другими детектируемыми метками, такими как флуоресцентные метки, люминесцентные метки, колориметрические метки или радиоизотопы. Протоколы и наборы для иммуноблоттинга хорошо известны в данной области техники и доступны на коммерческой основе. Автоматизированные системы для иммуноблоттинга, например iBind Western Systems для вестерн-блоттинга (ThermoFisher, Waltham,

MA USA 02451), доступны на коммерческой основе. Иммуноблоттинг включает без ограничения вестерн-блоттинг, внутриклеточный вестерн-блоттинг и дот-блоттинг. Дот-блоттинг представляет собой упрощенную процедуру, при которой образцы белка не разделяют электрофорезом, а наносят пятнами непосредственно на мембрану. Вестерн-блоттинг в клетках предусматривает высеивание клеток в микротитровальные планшеты, фиксацию/пермеабиллизацию клеток и последующую детекцию с помощью меченного первичного антитела или немеченного первичного антитела с последующим меченым вторичным антителом, как описано в данном документе.

[00369] В других вариантах осуществления уровни экспрессии белковых продуктов, кодируемых маркерными генами, также можно детектировать с помощью описанных в данном документе антител в анализе методом проточной цитометрии, в том числе в анализе методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Аналогично ИНС-анализам или иммуноблоттингу, для детекции экспрессии белков в анализе методом FACS можно применять первичные антитела или антисыворотки, такие как поликлональные антисыворотки и моноклональные антитела, которые специфически нацелены на белковые продукты, кодируемые маркерными генами. В некоторых вариантах осуществления клетки окрашивают первичными антителами к конкретному целевому белку в течение периода времени, достаточного для того, чтобы произошло связывание антитела с антигеном, а связанные антитела можно детектировать с помощью прямых меток на первичных антителах, например, флуоресцентных меток или гаптеновых меток, таких как биотин, на первичных антителах. В других вариантах осуществления немеченное первичное антитело применяют в непрямом анализе, как описано выше, в сочетании с меченым флуоресцентной меткой вторичным антителом, специфичным к первичному антителу. FACS представляет собой способ сортировки или анализа смеси меченных флуоресцентной меткой биологических клеток, по одной клетке за раз, на основе специфического светорассеяния и флуоресцентных характеристик каждой клетки. Таким образом, проточный цитометр детектирует и сообщает об интенсивности помеченного флуорохромом

антитела, что указывает на уровень экспрессии целевого белка. Следовательно, уровень экспрессии белковых продуктов, кодируемых маркерными генами, можно детектировать с помощью антител к таким белковым продуктам. Нефлуоресцентные цитоплазматические белки также можно наблюдать при окрашивании пермеабелизированных клеток. Способы проведения окрашивания и анализов методом FACS хорошо известны специалисту в данной области и описаны в Teresa S. Hawley and Robert G. Hawley in *Flow Cytometry Protocols*, Humana Press, 2011 (ISBN 1617379506, 9781617379505).

[00370] В других вариантах осуществления уровни экспрессии белковых продуктов, кодируемых маркерными генами, также можно детектировать с помощью иммуноанализов, таких как иммуноферментный анализ (EIA) или ELISA. В данной области техники известны как EIA-, так и ELISA-анализы, например, для анализа широкого спектра тканей и образцов, в том числе крови, плазмы крови, сыворотки крови или костного мозга. Доступен широкий спектр форматов ELISA-анализа, см., например, патенты США №№ 4016043, 4424279 и 4018653, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. К ним относятся как однослойные, так и двухслойные или «сэндвич»-анализы неконкурентного типа, а также традиционные анализы конкурентного связывания. Данные анализы также предусматривают прямое связывание меченого антитела с целевым белком. Сэндвич-анализы являются широко применяемым форматом анализа. Существует ряд вариаций методики сэндвич-анализа. Например, в типичном прямом анализе немеченное антитело иммобилизуют на твердой подложке и в контакт со связанной молекулой приводят подлежащий тестированию образец. Затем, после подходящего периода инкубации, в течение периода времени, достаточного для образования комплекса антитела с антигеном, добавляют второе антитело, специфичное к антигену, меченное репортерной молекулой, способной вырабатывать детектируемый сигнал, и инкубируют, давая время, достаточное для образования другого комплекса антитела с антигеном и с меченым антителом. Любой непрореагировавший материал смывают, а наличие антигена определяют путем наблюдения за сигналом, вырабатываемым репортерной молекулой. Результаты

могут быть либо качественными при простом наблюдении видимого сигнала, либо могут быть оценены количественно путем сравнения с контрольным образцом, содержащим известные количества целевого белка.

[00371] В некоторых вариантах осуществления EIA- или ELISA-анализов фермент конъюгирован со вторым антителом. В других вариантах осуществления для получения детектируемого сигнала в формате ELISA-анализа вместо меченных ферментом вторичных антител можно применять меченные флуоресцентной меткой вторичные антитела. При активации освещением светом определенной длины волны меченное флуорохромом антитело поглощает энергию света, вызывая состояние возбудимости в молекуле с последующим испусканием света характерного цвета, визуально детектируемого с помощью светового микроскопа. Как и в EIA и ELISA, меченному флуоресцентной меткой антителу позволяют связаться с первым комплексом антитела с целевым белком. После смывания несвязанного реагента оставшийся третичный комплекс подвергают воздействию света соответствующей длины волны; наблюдаемая флуоресценция указывает на присутствие представляющего интерес целевого белка. Методики иммунофлуоресценции и EIA хорошо известны в данной области техники и раскрыты в данном документе.

[00372] Для описанных в данном документе иммуноанализов можно использовать любой из ряда ферментов или неферментных меток при условии, что можно детектировать соответственно ферментативную активность или неферментную метку. Таким образом, фермент вырабатывает детектируемый сигнал, который можно использовать для детекции целевого белка. Особенно пригодными детектируемыми сигналами являются хромогенные или флуорогенные сигналы. Соответственно, к особенно пригодным ферментам для применения в качестве метки относятся ферменты, для которых доступен хромогенный или флуорогенный субстрат. Такие хромогенные или флуорогенные субстраты могут быть преобразованы ферментативной реакцией в легко детектируемый хромогенный или флуоресцентный продукт, который можно легко детектировать и/или количественно оценить с помощью

микроскопии или спектроскопии. Такие ферменты хорошо известны специалистам в данной области техники, в том числе без ограничения пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоксидаза и др. (см. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996)). К другим ферментам, которые имеют хорошо известные хромогенные или флуорогенные субстраты, относятся различные пептидазы, при этом хромогенные или флуорогенные пептидные субстраты можно использовать для детекции реакций протеолитического расщепления. Применение хромогенных и флуорогенных субстратов также хорошо известно в бактериальной диагностике, в том числе без ограничения применение α - и β -галактозидазы, β -глюкуронидазы, 6-фосфо- β -D-галактозид-6-фосфогалактогидролазы, α -глюкозидазы, α -глюкозидазы, амилазы, нейраминидазы, эстераз, липаз и др. (Manafi et al., *Microbiol. Rev.* 55:335-348 (1991)), и такие ферменты с известными хромогенными или флуорогенными субстратами могут быть легко адаптированы для применения в способах по настоящему изобретению.

[00373] Различные хромогенные или флуорогенные субстраты для выработки детектируемых сигналов хорошо известны специалистам в данной области техники и доступны на коммерческой основе. К иллюстративным субстратам, которые можно использовать для выработки детектируемого сигнала, относятся без ограничения 3,3'-диаминобензидин (DAB), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ), хлорнафтол (4-CN) (4-хлор-1-нафтол), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) (ABTS), дигидрохлорид о-фенилендиамина (OPD) и 3-амино-9-этилкарбазол (AEC) для пероксидазы хрена, 5-бром-4-хлор-3-индолил-1-фосфат (BCIP), нитросиний тетразолий (NBT), прочный красный (Fast Red TR/AS-MX) и *p*-нитрофенилфосфат (PNPP) для щелочной фосфатазы, 1-метил-3-индолил- β -D-галактопиранозид и 2-метокси-4-(2-нитровинил)фенил- β -D-галактопиранозид для β -галактозидазы, 2-метокси-4-(2-нитровинил)фенил- β -D-глюкопиранозид для α -глюкозидазы и др. К иллюстративным флуорогенным субстратам относятся без ограничения 4-(трифторметил)умбеллиферилфосфат для щелочной фосфатазы, 4-метилумбеллиферилфосфат-бис(2-амино-2-метил-1,3-пропандиол), 4-

метилумбеллиферилфосфат-бис(циклогексиламмоний) и 4-метилумбеллиферилфосфат для фосфатаз, QuantaBlu™ и QuantaRed™ для пероксидазы хрена, 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид, флуоресцеин-ди(β-D-галактопиранозид) и нафтофлуоресцеин-ди(β-D-галактопиранозид) для β-галактозидазы, 3-ацетилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид и 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид для β-глюкозидазы, а также 4-метилумбеллиферил-α-D-галактопиранозид для α-галактозидазы. Иллюстративные ферменты и субстраты для выработки детектируемого сигнала также описаны, например, в публикации США 2012/0100540. Различные детектируемые ферментные субстраты, в том числе хромогенные или флуорогенные субстраты, хорошо известны и доступны на коммерческой основе (Pierce, Рокфорд, Иллинойс; Santa Cruz Biotechnology, Даллас, Техас; Invitrogen, Карлсбад, Калифорния; 42 Life Science; Biocare). Обычно субстраты превращаются в продукты, образующие осадки, которые откладываются на определенном сайте целевой нуклеиновой кислоты. К другим иллюстративным субстратам относятся без ограничения HRP-Green (42 Life Science), Betazoid DAB, Cardassian DAB, Romulin AEC, Bajoran Purple, Vina Green, Deep Space Black™, Warp Red™, Vulcan Fast Red и Ferangi Blue от Biocare (Конкорд, Калифорния; biocare.net/products/detection/chromogens).

[00374] В некоторых вариантах осуществления иммуноанализов детектируемая метка может быть напрямую связана либо с первичным антителом, либо со вторичным антителом, которое позволяет детектировать немеченное первичное антитело. Иллюстративные детектируемые метки хорошо известны специалистам в данной области техники, в том числе без ограничения хромогенные или флуоресцентные метки (см. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996)). К иллюстративным флуорофорам, пригодным в качестве меток, относятся без ограничения производные родамина, например тетраметилродамин, родамин В, родамин 6G, сульфородамин В, тexasский красный (сульфородамин 101), родамин 110 и их производные, такие как тетраметилродамин-5-(или 6), лиссамина родамин В и т. п.; 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол (NBD); флуоресцеин и его производные; нафталины, такие как

дансил (5-диметиламинонафталин-1-сульфонил); производные кумарина, такие как 7-амино-4-метилкумарин-3-уксусная кислота (AMCA), 7-диэтиламино-3-[(4'-йодацетил)амино)фенил]-4-метилкумарин (DCIA), красители Alexa fluor (Molecular Probes) и т. п.; 4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен (BODIPY™) и его производные (Molecular Probes; Eugene Oreg.); пирены и сульфированные пирены, такие как Cascade Blue™ и их производные, в том числе 8-метоксипирен-1,3,6-трисульфоновая кислота и т. п.; производные пиридилоксазола и производные дапоксила (Molecular Probes); Lucifer Yellow (3,6-дисульфонат-4-аминонафталимид) и его производные; флуоресцентные красители CyDye™ (Amersham/GE Healthcare Life Sciences; Пискатауэй, Нью-Джерси) и т. п. К иллюстративным хромофорам относятся без ограничения фенолфталеин, малахитовый зеленый, нитроароматические соединения, такие как нитрофенил, диазокрасители, дабсил (4-диметиламиноазобензол-4'-сульфонил) и др.

[00375] Способы, хорошо известные специалисту в данной области техники, такие как микроскопия или спектроскопия, можно использовать для визуализации хромогенных или флуоресцентных детектируемых сигналов, ассоциированных со связанными первичными или вторичными антителами.

[00376] Способы, представленные в данном разделе (разделе 5.7), можно применять с различными моделями рака, известными в данной области техники. В одном варианте осуществления применяют модели ксенотрансплантата рака мышам. Вкратце: клетки T-24 и UM-UC-3 приобретают у ATCC и культивируют с применением рекомендованных условий среды. Клетки T-24 с hNectin-4 (человеческий нектин-4) и UM-UC-3 с Nectin-4 создают путем трансдукции исходных клеток лентивирусом, содержащим человеческий нектин-4 с использованием конструкции pRCDCMEP-CMV-hNectin-4 EF1-Puro, и отбирают с применением пурамицина. Клетки T-24 с нектином-4 (клон 1A9) имплантируют бестимусным мышам и пассируют через троакары, позволяют опухоли достичь примерно 200 мм³, а затем обрабатывают однократной внутрибрюшинной (IP) дозой энфортумаба ведотина (3 мг/кг) или

несвязывающимся ADC (3 мг/кг), при этом на группу обработки приходится 7 животных. Последующие исследования ICD с использованием данной модели предусматривают сбор опухолей через 5 дней после обработки для последующего анализа методом РНК-секвенирования, проточной методики, иммуногистохимии (ИНС) и Luminex. Опухоли фиксируют в формалине и готовят в виде FFPE-блоков тканей. Блоки нарезают по 4 мкм и проводят иммуногистохимический анализ с применением F4/80, CD11c. Срезы в виде препаратов, окрашенных иммуногистохимическим методом, сканируют с помощью цифрового сканера для цельных препаратов Leica AT2, а изображения анализируют с помощью программного обеспечения Visiopharm с применением специально разработанных алгоритмов для окрашивания нектин 4, CD11c и F4/80. Алгоритмы оптимизированы по интенсивности окрашивания и окрашиванию фона. Рассчитывают процент положительного окрашивания для нектин 4 и рассчитывают положительные клетки на мм² для F480 и CD11c.

[00377] Срезы опухоли лизируют в буфере для лизиса клеток Cell Lysis Buffer 2 (R&D Systems®, каталожный № 895347). Цитокины и хемокины из образцов опухолей измеряют с применением панели магнитных микроносителей для мышинных цитокинов/хемокинов MILLIPLEX MAP (Millipore) и считывают на системе LUMINEX MAGPIX.

[00378] Для анализа методом РНК-секвенирования РНК из быстрозамороженных опухолей выделяют с помощью набора для очистки РНК TRIZOL Plus (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя, что дает РНК высокого качества (средний показатель целостности РНК >8). Способ отбора РНК предусматривает использование отбора по Poly(A) и набора для подготовки библиотеки мРНК от Illumina, а также считывание на Hi-Seq 2 x 150 п. о., одноиндексным методом (Illumina). Результаты прочтения последовательности картируют относительно человеческого и мышинного транскриптома и определяют общее количество прочтений на миллион.

[00379] Настоящее изобретение в целом представлено с использованием утвердительных формулировок для описания многочисленных вариантов осуществления. Настоящее изобретение также, в частности, включает варианты осуществления, в которых полностью или частично исключен конкретный предмет изобретения, такой как вещества или материалы, стадии и условия способа, протоколы, процедуры, аналитические методы или анализ. Таким образом, даже несмотря на то, что настоящее изобретение в целом не выражено в данном документе в отношении того, что оно не включает, в данном документе, тем не менее, раскрыты аспекты, которые явно не включены в настоящее изобретение.

[00380] В данном документе описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, в том числе наилучший вариант, известный авторам настоящего изобретения, для реализации настоящего изобретения. При прочтении приведенного описания для специалистов в данной области техники могут стать очевидны модификации раскрываемых вариантов осуществления, и ожидается, что специалисты в данной области техники при необходимости смогут использовать такие модификации. Соответственно, предполагается, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе, и что настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено применимым законодательством. Более того, настоящим изобретением охватывается любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту.

[00381] Все публикации, патентные заявки, регистрационные номера и другие литературные источники, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

[00382] Был описан ряд вариантов осуществления настоящего изобретения. Тем не менее, следует понимать, что могут быть выполнены различные модификации без отступления от сути и объема настоящего изобретения.

6. Примеры

6.1 Пример 1. Исследование эффективности и безопасности внутрипузырного введения энфортумаба вевотина на животных моделях

6.1.1 Исследование эффективности на мышинной модели ортотопического нектин-4⁺ ксенотрансплантата мочевого пузыря

[00383] Целью данного исследования было измерение эффективности внутрипузырного введения энфортумаба вевотина (EV) на мышинной модели ортотопического нектин-4⁺ ксенотрансплантата мочевого пузыря. В частности, и без ограничения каким-либо конкретным механизмом действия, местное введение EV посредством внутрипузырного введения может обеспечить непосредственное воздействие EV на клетки NMIBC с уменьшенным содержанием в системном кровотоке и улучшенным профилем безопасности по сравнению с системным введением EV.

[00384] В таблице 6 продемонстрирован выбор дозы для доклинических экспериментов на мышах и крысах. Мышиная ортотопическая модель была разработана на мышах SCID с использованием линии клеток уротелиального рака мочевого пузыря человека под названием UM-UC-3, которая была сконструирована для экспрессии человеческого нектин-4 и люциферазы (т. е. UM-UC-3-hNectin4⁺-Luc⁺). Оценки безопасности проводили на крысах, поскольку EV связывается с сопоставимой аффинностью с ортологами человеческого и крысиного нектин-4.

Таблица 6. Выбор дозы

	Общая доза (мг)	Концентрация дозы (мг/мл)	Уровень дозы ^a (мг/кг)	Доза/мочевой пузырь, Площадь поверхности ^b (мг/см ²)
Мышь	0,75	15	30	0,5
Крыса	2	5	10	0,4
	6	15	30	1,2
	12	30	60	2,5
	20	50	100	4,1
Человек (одобренная общая IV доза)	125			0,4

^aПредполагается, что пациент имеет вес 78 кг (средний вес тела популяционной фармакокинетической модели EV), крыса имеет вес 200 г, а мышь — 25 г.

^bПлощадь поверхности мочевого пузыря, полученная по объему мочевого пузыря, где $V=(4/3)\pi r^3$ и $SA=4\pi r^2$ (Andersson KE, et al. *Physiol Rev.* 2004;84:935-986). Примечание: масштабирование дозы по площади поверхности тела нецелесообразно в связи с ограниченным содержанием в системном кровотоке и по причине местного пути введения дозы, вместо этого общая доза была нормализована по площади поверхности ткани мочевого пузыря для обеспечения соответствующих доклинических доз (U.S. Food and Drug Administration. *Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* 2005. www.fda.gov/media/72309/download. Accessed March 1, 2022).

[00385] Нектин-4 характеризуется высоким уровнем экспрессии на всех стадиях рака мочевого пузыря, в том числе рака мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC) и рака мочевого пузыря с инвазией в мышечный слой (MIBC) (данные не представлены). Для оценки цитотоксической активности EV *in vitro* в условиях, имитирующих внутрипузырное введение дозы, клетки карциномы мочевого пузыря со сверхэкспрессией нектина-4 (UM-UC-3-hNectin-4⁺) подвергали воздействию либо EV, либо неконъюгированного антитела к нектину-4, либо неконъюгированного MMAE, либо контрольного ADC (ФИГ. 2). IV введение дозы моделировали путем осуществления воздействия на клетки

в течение 96 часов. Внутрипузырное введение дозы моделировали посредством различных типов воздействия в течение 2 и 24 часов с последующим вымыванием тестируемого изделия. Гибель клеток измеряли с помощью Cell TiterGlo® (Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин, США). Снижение воздействия с 96 до 2 часов снижало эффективность (EC₉₀) в 44 раза в случае неконъюгированного MMAE, но почти не изменялось в случае EV (снижалось в 2 раза). Контрольный ADC и неконъюгированное антитело к нектину-4 не приводили к достаточной активности для определения EC₉₀ (данные не представлены). Таким образом, EV сохраняет цитотоксическую активность *in vitro* при применении условий, имитирующих внутрипузырное введение дозы (ФИГ. 2).

[00386] Для создания мышинной модели ортотопического нектин-4⁺ ксенотрансплантата мочевого пузыря трансдуцированные люциферазой UM-UC-3-hNectin4⁺-Luc⁺ клетки рака мочевого пузыря вводили трансуретрально через катетер мышам линии SCID-beige (ФИГ. 3А). Всего в данном исследовании было использовано 18 мышей: 3 мыши оставались без обработки (ФИГ. 3В, крайняя левая секция под названием «Без обработки»), 5 мышам посредством 2-часового внутрипузырного введения вводили стерильную воду один раз в неделю в течение двух недель (ФИГ. 3В, вторая секция слева под названием «Среда (SWFI), 2-часовое внутрипузырное введение»); 5 мышей обрабатывали один раз в неделю в течение двух недель посредством 2-часового внутрипузырного введения по 0,75 мг EV (0,05 мл EV в количестве 15 мг/мл (примечание: концентрация дозы 15 мг/мл у мышей соответствует соотношению доза/площадь поверхности мочевого пузыря, равному 0,5 мг/см² у мышей) (ФИГ. 3В, третья секция слева под названием «EV, 2-часовое внутрипузырное введение»); 5 мышей обрабатывали один раз в неделю в течение двух недель посредством внутривенного введения 0,75 мг EV (0,25 мл EV в количестве 3 мг/мл) (ФИГ. 3В, крайняя правая секция под названием «IV доза EV»). Для измерения эффективности EV мышей подвергали визуализации. Кроме того, у каждой из подвергнутых обработке мышей спустя 24 часа после EV введения

брали кровь для фармакокинетического анализа. Используемые в данном случае способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

[00387] Как видно из результатов билюминесцентной визуализации на **ФИГ. 3В**, опухоли мочевого пузыря выросли сильнее у не подвергнутых обработке мышей и у мышей, обработанных посредством 2-часового внутрипузырного введения стерильной воды (**ФИГ. 3В**, крайняя левая секция под названием «Без обработки» и вторая секция слева под названием «Среда (SWFI, 2-часовое внутрипузырное введение)»). В отличие от этого, наблюдали существенную регрессию опухолей мочевого пузыря у мышей, которых обрабатывали посредством 2-часового внутрипузырного введения EV, а также у мышей, которых обрабатывали посредством внутривенного введения EV (**ФИГ. 3В**, третья секция слева под названием «2-часовое внутрипузырное введение EV» и крайняя правая секция под названием «IV доза EV»). Результаты иммуногистохимического анализа антитела к нектину-4, представленные на **ФИГ. 3С**, также свидетельствуют, что опухоли мочевого пузыря регрессировали у мышей, которые были обработаны посредством 2-часового внутрипузырного введения EV. Ткань мочевого пузыря на пяти правых секциях на **ФИГ. 3С** получены от пяти мышей, которым вводили внутрипузырные дозы EV на **ФИГ. 3В** соответственно. Кроме того, результаты билюминесцентной визуализации на **ФИГ. 3В** были подвергнуты количественной оценке и приведены на **ФИГ. 3Д**, а также в таблице 7. У мышей, которые были обработаны посредством 2-часового внутрипузырного введения EV, ингибирование роста опухоли (TGI) составляло 97,1% на день 17 (по результатам измерения посредством анализа единиц интегрального потока (фотонов/секунду) по сравнению с контролем) (**ФИГ. 3В**, третья секция слева под названием «2-часовое внутрипузырное введение EV» **ФИГ. 3Д**, а также таблица 7).

Таблица 7. Ингибирование роста опухоли посредством EV в ортотопической модели NMIBC

Обработка	Группа	Уровень дозы	Путь введения	% TGI
Без обработки	1	N/A	N/A	0,0
Среда	2	N/A	Внутрипузырное введение	57,4
AGS-22C3E	3	15 мг/мл	Внутрипузырное введение	97,1
AGS-22C3E	4	3 мг/кг	IV	99,9

Ингибирование роста опухоли рассчитывали по среднему сигналу биолюминесценции от опухоли в сравнении с контрольной группой без обработки в конце исследования (через 16 дней после начала исследования). Внутрипузырная доза, равная 15 мг/мл, представляла собой общую дозу 750 мкг и представляла собой дозу 0,5 мг/см² площади поверхности мочевого пузыря. Общая доза EV, вводимая внутривенно, была примерно в 10 раз ниже, 75 мкг на мышь с весом 25 грамм.

[00388] Кроме того, проводили иммуногистохимическое (ИНС) окрашивание для оценки локализации нектин-4 и ММАЕ в ткани опухоли мочевого пузыря (**ФИГ. 3Е**). В частности, через шесть (6) часов после первой дозы EV собирали опухоли и окрашивали их по нектину-4 и антителу к ММАЕ, результаты чего представлены на **ФИГ. 3Е**. По результатам анализа методом ИНС было видно присутствие нектин-4 в ткани опухоли мочевого пузыря с совместной локализацией лекарственного средства, что было детектировано с помощью конъюгированных с биотином первичных антител к ММАЕ.

[00389] Приведенные выше результаты подтверждают прививку опухоли (NMIBC) и внутрипузырную активность EV у используемой в данном контексте мышинной модели ортотопического нектин-4⁺ ксенотрансплантата мочевого пузыря.

6.1.2 Исследование безопасности на крысах линии Спрэг-Дули

[00390] Целью данного исследования было изучение влияния на местные ткани, значений концентрации в плазме крови и уровни лекарственного средства в тканях у крыс линии Спрэг-Дули после однократной внутрипузырной дозы

энфортумаба ведотина (EV) в различных концентрациях и объемах введения вплоть до максимально возможной концентрации для ресуспендированного EV.

[00391] Однократные дозы, равные 0,1, 0,2 или 0,4 мл EV в концентрации 15, 30 или 50 мг/мл, вводили внутривенно самкам крыс линии Спрэг-Доули на два часа в соответствии со схемой исследования, представленной в таблице 8.

Таблица 8. Схема исследования

Группа	Обработка (однократная доза)	Концентрация дозы (мг/мл)	Объем дозы (мл)	Общая доза (мг)	Количество крыс (самок)		Моменты времени эвтаназии (часов после введения дозы)
					24 ч	168 ч	
1	Контроль	0	0,4	0	3	3	24 ч (n=3/группа); 168 ч (n=3/группа)
2	Буфер для составления	0	0,4	0	3	3	
3	Энфортумаба ведотин	15	0,1	1,5	3	3	
4	Энфортумаба ведотин	15	0,2	3	4	3	
5	Энфортумаба ведотин	15	0,4	6	3	3	
6	Энфортумаба ведотин	30	0,1	3	3	3	
7	Энфортумаба ведотин	30	0,2	6	3	3	
8	Энфортумаба ведотин	30	0,4	12	3	3	
9	Энфортумаба ведотин	50	0,12	6	3	3	
10	Энфортумаба ведотин	50	0,24	12	3	3	
11	Энфортумаба ведотин	50	0,4	20	3	3	

[00392] Для определения концентраций ADC и MMAE в локальных тканях (почки, мочевого пузыря, мочеточника и уретры) у каждой крысы через 24 часа после введения EV собирали данные ткани для биоанализа и иммуногистохимического (ИНС) анализа с применением антител к MMAE. Для определения сывороточных концентраций ADC и MMAE у каждой крысы в различные моменты времени (1 час, 6 часов, 24 часа, 72 часа и 168 часов после введения EV) брали по 300 мкл крови для биоанализа. Используемые в данном случае способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

[00393] Как видно из результатов биоанализа, представленных на **ФИГ. 4А** и **4В**, и результатов ИНС с применением антител к MMAE, представленных в таблице 9, более высокая концентрация дозы и общая доза, превышающая больший объем инстилляций, приводили к более высоким уровням MMAE в ткани мочевого пузыря. В частности, на **ФИГ. 4А** представлены однократные внутрипузырные дозы EV, которые вводили самкам крыс в дозах 0,3-4,1 мг/см² в концентрации 15-50 мг/мл с временем пребывания в организме 2 часа, которые представляют собой дозы до 100 мг/кг по массе. Уровни общего MMAE в мочевом пузыре через 24 часа нормализовали по весу ткани мочевого пузыря. MMAE детектировали в ткани мочевого пузыря в течение срока до 7 дней с пиковыми концентрациями в течение 24 часов после введения дозы. Кроме того, уровень MMAE обычно не поддавался детектированию, а в сыворотке крови детектировали минимальный уровень ADC (<1 нг/мл). Никакой значимой разницы в общих уровнях MMAE не было, когда концентрация поддерживалась постоянной, а время пребывания в организме варьировало в диапазоне от 30 до 120 минут (данные не представлены). Таким образом, введение более высокой общей дозы и концентрации EV сильнее повысит активность и увеличит уровень лекарственного средства в тканях, нежели изменение инстиллируемого объема или времени пребывания в организме. Приведенные выше результаты свидетельствуют, что однократные внутрипузырные дозы 0,1, 0,2 или 0,4 мл энфортумаба ведотина в концентрации 15, 30 или 50 мг/мл самкам крыс линии Спрэг-Доули переносились хорошо. Следовательно, внутрипузырное введение

EV делает возможным эффективное локальное введение EV с ограниченным содержанием в системном кровотоке у крыс линии Спрэг-Доули.

Таблица 9. Уровень антител к ММАЕ методом ИНС в локальных тканях

Обработка:	вода	среда	энфортумаба ведотин																					
			0	1,5	3	6	12	30	60	120	300	600	1200	2400										
общая доза (мг):	0	0	0	1,5	3	6	12	30	60	120	300	600	1200	2400										
концентрация (мг/мл):	0	0	0	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15										
объем (мл):	0,4	0,4	0,4	0,1	0,2	0,4	0,4	0,1	0,2	0,4	0,4	0,12	0,24	0,4										
Количество животных:	1 5 1	2 5 3	2 5 1	3 5 2	4 5 3	4 5 2	4 5 3																	
МО-ЧЕВОЙ ПУЗЫРЬ	-	-	-	2	-	-	-	1	3	2	-	1	-	4	4	2	2	-	4	3	4	4	3	
ПОЧКА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
МОЧЕЧОЧНИК	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
УРЕТРА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
РА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Оценка в баллах методом ИНС - окрашивание переходных клеток

Оценка в баллах методом ИНС:
 - = <1% положительного окрашивания переходных клеток
 1 = 1-25% положительных
 2 = 26-50% положительных
 3 = 50-75% положительных
 4 = >75% положительных

[00394] Для оценки потенциала токсичности и изучения фармакокинетики внутрипузырного EV самкам крыс вводили шесть (6) еженедельных внутрипузырных доз EV или контрольного препарата. Как видно из таблицы 10, в ранее выявленных целевых тканях, в том числе коже и костном мозге, не было обнаружено никаких микроскопических данных. Доза, соответствующая уровню отсутствия эффекта EV, эквивалентна >20-кратной одобренной IV дозе для человека.

Таблица 10. Исследование токсичности дозы

Уровень еженедельной внутрипузырной дозы	Клинические признаки, клиническая патология, вес органов, смертность, макроскопические данные	Микроскопические данные	Выводы
0,1 мг/см ² (3 мг/кг)	Нет данных, связанных с EV	Нет данных, связанных с EV	--
0,4 мг/см ² (10 мг/кг)	Нет данных, связанных с EV	Нет данных, связанных с EV	Уровень, не дающий наблюдаемого эффекта (NOEL)
1,2 мг/см ² (30 мг/кг)	Нет данных, связанных с EV	Минимальные/незначительные митотические/апоптотические формы в переходном эпителии почек и мочевого пузыря.	Уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL)

[00395] Определяли сывороточную концентрацию введенного внутрипузырно EV после первой дозы EV с помощью валидированного ELISA-анализа (среднее значение \pm SEM) (ФИГ. 5). Среднее значение C_{\max} EV составляло ≤ 750 нг/мл

(т. е. в >35 раз ниже IV C_{\max} клинически одобренной дозы), а по результатам валидированного масс-спектрометрического анализа ММАЕ в сыворотке крови не детектировался. Оценка площади под кривой зависимости времени от концентрации в сыворотке крови была ограничена лишь наиболее высокой дозой EV (30 мг/кг), которую можно было детектировать лишь в течение 24 часов после инстилляции. Сывороточные концентрации неконъюгированного ММАЕ были ниже нижнего предела количественного определения (<10 пг/мл). Таким образом, внутрипузырное введение EV ограничивает содержание в системном кровотоке низкой и нестационарной системной абсорбцией.

[00396] Следовательно, в таблице 9 и на **ФИГ. 5** видно, что внутрипузырное введение EV хорошо переносилось без детектируемой местной или системной токсичности, а также с низкой и нестационарной системной абсорбцией. Без ограничения каким-либо конкретным механизмом действия эти данные также свидетельствуют, что низкая системная абсорбция внутрипузырного EV может снижать частоту наиболее распространенных нежелательных явлений, наблюдаемых при системном введении EV.

6.1.3 Влияние продолжительности времени пребывания в организме на крысах линии Спрэг-Дули

[00397] Целью данного исследования было определение уровней ММАЕ в ткани мочевого пузыря у крыс линии Спрэг-Дули после внутрипузырного введения энфортумаба ведотина (EV) в течение различной продолжительности времени пребывания в организме.

[00398] В частности, 24 самок крыс линии Спрэг-Дули случайным образом разбивали на 4 группы (по 6 крыс в группе). Каждой крысе на 30, 60, 90 или 120 минут внутрипузырно вводили однократную дозу 0,4 мл EV в концентрации 30 мг/мл. Спустя 24 часа после введения EV у каждой крысы брали ткань мочевого пузыря для биоанализа с целью определения концентраций ММАЕ в тканях мочевого пузыря. Используемые в данном случае способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

[00399] Как видно на **ФИГ. 6**, не было значимой разницы в уровнях ММАЕ в ткани мочевого пузыря у крыс, которым внутривезикулярно вводили EV с различной продолжительностью времени пребывания в организме, варьирующей в диапазоне от 30 минут до 120 минут. В присутствии факторов, в том числе слизистого слоя, который потенциально может ингибировать доступ ADC к целевым клеткам и контролировать диффузию в большей степени, чем в случае традиционных малых молекул, такой результат в условиях *in vivo* является несколько неожиданным. Без привязки к теории, судя по всему, относительно короткое время пребывания в организме может быть достаточным для насыщения у крыс ткани мочевого пузыря посредством ММАЕ.

6.2 Гипотетический пример 2. Открытое многоцентровое исследование 1-й фазы с увеличением доз и расширением периода введения доз, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, PK и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина у взрослых с раком мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC)

6.2.1 Лекарственное средство для применения в клиническом исследовании

[00400] Энфортумаба ведотин представляет собой нацеленное на нектин-4 моноклональное антитело (AGS-22C3), ковалентно связанное с разрушающим микротрубочки средством под названием монометилауристатин E (ММАЕ). Энфортумаба ведотин содержит три функциональные субъединицы:

- полностью человеческое антитело IgG1K (AGS-22C3);
- разрушающее микротрубочки средство ММАЕ;
- расщепляемый протеазой линкер малеимидакапроил-валин-цитруллин (vc), который посредством ковалентной связи соединяет ММАЕ с AGS-22C3.

[00401] Энфортумаба ведотин связывает V-домен нектин-4 (Challita-Eid *et al.*, Cancer Res (2016); 76(10): 3003-13.). Согласно предполагаемому механизму

действия, данное лекарственное средство связывает белок нектин-4 на поверхности клетки и интернализируется, что приводит к протеолитическому расщеплению линкера vc и внутриклеточному высвобождению ММАЕ. Затем свободный ММАЕ нарушает полимеризацию тубулина и приводит к блокировке митоза.

6.2.2 Краткое описание исследования

6.2.2.1 *Название протокола*

[00402] Исследование внутрипузырного применения энфортумаба ведотина для лечения пациентов с раком мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC)

6.2.2.2 *Цели исследования*

[00403] Основная цель

- Оценить безопасность и переносимость внутрипузырного введения энфортумаба ведотина у субъектов с NMIBC
- Выявить максимально переносимую дозу (MTD) или рекомендуемую дозу внутрипузырного энфортумаба ведотина у субъектов с NMIBC

[00404] Вторичная цель

- Оценить фармакокинетику (PK) внутрипузырного введения энфортумаба ведотина
- Оценить иммуногенность внутрипузырного введения энфортумаба ведотина
- Оценить противоопухолевую активность внутрипузырного энфортумаба ведотина, измеряемую по частоте полного ответа (CR)
- Оценить продолжительность CR

- Оценить частоту цистэктомии
- Оценить продолжительность жизни без прогрессирования (PFS)
- Оценить продолжительность жизни без цистэктомии (PFS)

[00405] Исследовательская цель

- Оценить биомаркеры в отношении ответа, токсичности, фармакодинамики, взаимосвязи фармакокинетики/фармакодинамики (PK/PD) или устойчивости к энфортумаба ведотину
- Оценить регистрируемый субъектом опыт и регистрируемую в отчете субъектом переносимость лечения

6.2.2.3 *Исследуемый контингент*

[00406] Критерии включения

1. У субъектов должна быть подтвержденная гистологическим методом уротелиальная (переходно-клеточная) карцинома без инвазии в мышечный слой с карциномой *in situ* (CIS) (с папиллярным заболеванием или без него). Гистологическое подтверждение должно иметь место в пределах 60 дней до введения первой дозы исследуемого средства лечения.

2. Преобладающим гистологическим компонентом (>50%) должна быть уротелиальная (переходно-клеточная) карцинома. Исключают чистые по гистологии варианты.

3. Субъекты должны иметь высокий риск развития заболевания, не дающего ответа на бациллу Кальмета-Герена (BCG), определяемого следующим образом:

- персистирующее или рецидивирующее заболевание CIS в отдельности или с рецидивирующим заболеванием Ta/T1 (неинвазивное папиллярное заболевание/опухоль с проникновением в субэпителиальную соединительную

ткань) в пределах 12 месяцев после завершения надлежащей терапии посредством BCG.

Надлежащая терапия посредством BCG имеет одно из следующих определений:

- 5 из 6 доз начального курса индукции + по меньшей мере 2 из 3 доз терапии поддержания дозы;
- 5 из 6 доз начального курса индукции + по меньшей мере 2 из 6 доз второго курса индукции.

Примечание: субъекты, которые не могут завершить надлежащий курс или получать сниженную дозу терапии посредством BCG в результате нехватки BCG в мире, имеют право на участие в исследовании после консультации с медицинским наблюдателем.

4. По мнению исследователя, для субъекта должна быть недопустима радикальная цистэктомия, или субъект отказывается от нее.

5. Все видимые папиллярные опухоли Ta/T1 должны быть полностью удалены в пределах 60 дней до набора для участия в исследовании. Допускается наличие остаточной истинной CIS.

- Все субъекты, у которых отмечено наличие опухолей T1, перед началом исследуемого средства лечения должны пройти дополнительную повторную TURBT (трансуретральную резекцию опухоли мочевого пузыря). Повторная стадия TURBT должна показать отсутствие поражения (отсутствие опухоли) собственной мышечной оболочки.

6. Субъекты должны иметь удовлетворительную функцию мочевого пузыря и способность удерживать исследуемое лекарственное средство в течение как минимум 1 часа, даже при приеме лекарственного средства для премедикации.

7. Иметь возраст 18 лет и старше.

8. Оценка в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равная 0, 1 или 2, для преобразования функционального статуса с помощью шкалы Карновского, если применимо).

Субъекты с функциональным статусом по ECOG, равным 2, должны дополнительно соответствовать следующим критериям:

- скорость клубочковой фильтрации (GFR) ≥ 50 мл/мин.;
- могут не иметь сердечной недостаточности III класса по системе Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).

9. Следующие лабораторные данные на исходном уровне:

- абсолютное количество нейтрофилов (ANC) ≥ 1500 /мкл;
- гемоглобин (Hgb) ≥ 10 г/дл;
- количество тромбоцитов ≥ 100000 /мкл;
- сывороточный билирубин $\leq 1,5 \times$ верхнего предела нормы (ULN) или $\leq 3 \times$ ULN для субъектов с болезнью Жильбера;
- расчетный клиренс креатинина (CrCl) ≥ 30 мл/мин (вместо креатинина или CrCl также можно использовать GFR); CrCl следует рассчитывать с помощью способа Кокрофта-Голта или уравнений модификации диеты при заболеваниях почек (MDRD); субъекты с функциональным статусом по ECOG, равным 2, должны иметь GFR ≥ 50 мл/мин;
- аланинаминотрансфераза (ALT) и аспартатаминотрансфераза (AST) $\leq 3 \times$ ULN;
- международный нормализационный индекс (INR) или протромбиновое время (PT); активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT) или частичное тромбопластиновое время (PTT) $\leq 1,5$ ULN, если только субъект не

получает антикоагулянтную терапию, при условии, что РТ или аРТТ находится в пределах терапевтического диапазона предусмотренного применения антикоагулянтов.

10. Расчетная продолжительность жизни >2 лет.

11. Субъектом женского пола с репродуктивным потенциалом является любое лицо, родившееся женщиной, у которой начались менструации и которая не подвергалась хирургической стерилизации (например, гистерэктомии, двусторонней сальпингэктомии, двусторонней овариэктомии) или не вошла в фазу менопаузы. С клинической точки зрения менопауза определяется как 12-месячное отсутствие менструаций у человека старше 45 лет при отсутствии других биологических, физиологических или фармакологических причин. Субъекты женского пола с репродуктивным потенциалом должны соответствовать следующим условиям:

- согласны не пытаться забеременеть во время исследования и в течение по меньшей мере 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства;
- должны иметь отрицательный результат теста на беременность сыворотки крови или мочи (минимальная чувствительность 25 мМЕ/мл или эквивалентных единиц бета-хорионического гонадотропина человека [β -hCG]) в пределах 3 дней до дня 1 исследования; к участию допускают субъектов женского пола с ложноположительными результатами и документально подтвержденным отрицательным статусом беременности;
- если присутствует активность с гетеросексуальным партнером, должны последовательно применять высокоэффективные способы контроля над рождаемостью со степенью ненадежности менее 1%, начиная с момента скрининга, на протяжении всего периода исследования и в течение по меньшей мере 6 месяцев после последней дозы исследуемого лекарственного средства;

- субъекты женского пола должны согласиться не кормить грудью и не сдавать яйцеклетки, начиная с момента скрининга и на протяжении всего периода исследования, а также в течение по меньшей мере 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

12. Субъектом мужского пола, который может стать отцом детей, является любой человек, имеющий при рождении мужской пол, у которого есть семенники и который не подвергался хирургической стерилизации (например, вазэктомии с последующим клиническим тестом, доказывающим эффективность процедуры). Субъекты мужского пола, которые могут стать отцом детей, должны соответствовать следующим условиям:

- не должны сдавать сперму, начиная с момента скрининга и на протяжении всего периода исследования, а также в течение по меньшей мере 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства; субъекты мужского пола проинформированы о негативном риске для репродуктивной функции и фертильности в результате воздействия исследуемого средства лечения; перед началом лечения субъектам мужского пола следует рекомендовать ознакомиться с информацией о сохранении фертильности и криоконсервации спермы;

- должны последовательно применять высокоэффективные способы контроля над рождаемостью со степенью ненадежности менее 1%, начиная с момента скрининга, на протяжении всего периода исследования и и продолжать в течение по меньшей мере 6 месяцев после последней дозы исследуемого лекарственного средства;

- субъекты мужского пола, у которых есть беременная или кормящая партнерша(партнерши), должны постоянно применять один из 2 вариантов контрацепции для предупреждения вторичного воздействия семенной жидкости на протяжении всего периода беременности или времени, когда партнерша кормит грудью, на протяжении всего периода исследования и в течение по

меньшей мере 6 месяцев после последней дозы исследуемого лекарственного средства.

13. Субъект должен предоставить письменное информированное согласие.

[00407] Критерии исключения

1. Наличие в анамнезе текущей или предыдущей уротелиальной карциномы с инвазией в мышечный слой (т.е. заболевания T2, T3 или T4) или метастатического заболевания.

2. Узловое или метастатическое заболевание, видимое на компьютерной томографии (СТ) или магнитно-резонансной томографии (MRI), проведенной в пределах 3 месяцев до начала исследуемого лечения.

3. Сопутствующая уротелиальная карцинома верхних отделов мочеточника, наблюдаемая на урограмме СТ или MRI с контрастированием органов брюшной полости/таза, проведенной в пределах 3 месяцев до начала исследуемого лечения.

4. Субъекты, у которых известно о наличии предшествующей или сопутствующей уротелиальной карциномы простатической части уретры по оценке исследователя, в пределах 6 месяцев до начала исследуемого лечения.

5. Субъекты со связанным с опухолью гидронефрозом на момент скрининга (допускаются субъекты с гидронефрозом, вызванным отличными от опухоли причинами, если это санкционировано исследователем).

6. Субъект получал любую другую системную противораковую терапию (например, химиотерапию, биологическую терапию, иммунотерапию, целенаправленную терапию, эндокринную терапию, исследуемое средство) в пределах 4 недель до первой дозы исследуемого средства лечения или любую внутрипузырную терапию для лечения NMIBC в пределах 6 недель до начала исследуемого лечения, за исключением следующих случаев:

- цитотоксические средства (например, митомицин С, доксорубицин и гемцитабин) при введении в виде однократной инстилляции сразу после процедуры TURBT, что разрешено за 14-60 дней до начала исследуемого лечения.

7. У субъекта присутствуют постоянные симптомы (2-й степени тяжести и выше), вторичные по отношению к нежелательным явлениям (AE), связанным с предшествующей терапией в отношении NMIBC.

8. Субъект ранее проходил курс облучения мочевого пузыря для лечения уротелиального рака.

9. Активная инфекция, при которой необходимо системное (например, пероральное или внутривенное) применение антибиотиков в пределах 14 дней до начала исследуемого лечения. Принимаются участники, принимающие профилактические антибиотики (например, для профилактики инфекции мочевыводящих путей [UTI] или хронической обструктивной болезни легких).

10. Субъекты, которые не переносят внутрипузырное введение дозы или внутрипузырные хирургические манипуляции.

11. Наличие в анамнезе сведений о другом злокачественном новообразовании в пределах 3 лет до введения первой дозы исследуемого лекарственного средства или любых сведений об остаточном заболевании после ранее диагностированного злокачественного новообразования. Исключениями являются злокачественные новообразования с незначительным риском метастазирования или смертельного исхода (например, вероятность 5-летней общей продолжительности жизни [OS] $\geq 90\%$), такие как подвергнутая надлежащему лечению CIS шейки матки, немеланомная карцинома кожи, протоковая CIS молочной железы или I стадия рака матки.

- Наличие в анамнезе сведений о раке предстательной железы (T2N0M0 или ниже с оценкой в баллах по шкале Глисона ≤ 7), который был подвергнут лечению с определенным намерением (хирургической или лучевой терапии) по

меньшей мере за 1 год до набора для участия в исследовании, является приемлемым при условии, что субъект считается не болеющим раком предстательной железы и соблюдены следующие критерии:

(i). субъекты, перенесшие радикальную простатэктомию, должны иметь недетектируемый простатспецифический антиген (PSA) в течение >1 года и на момент скрининга;

(ii). субъекты, прошедшие курс облучения, должны иметь время удвоения уровня PSA >1 года (на основе по меньшей мере 3 значений, определенных с интервалом >1 месяца) и значение общего уровня PSA, которое не соответствует критериям Феникса для биохимического рецидива (т. е. <2,0 нг/мл выше максимального снижения уровня нейтрофилов, обусловленного проведением химиотерапии).

12. Предыдущее воздействие нацеленной на нектин-4 терапии или средства, содержащего монометилауристатин E (MMAE).

13. Субъекты с аутоиммунными или воспалительными нарушениями кожи, такими как псориаз или атопический дерматит, у которых имеется активное заболевание, нуждающееся в каком-либо лечении.

14. Субъекты с продолжающейся сенсорной или двигательной нейропатией 2-й степени тяжести или выше.

15. Субъекты с положительным поверхностным антигеном гепатита В и/или коровым антителом к антигену гепатита В. Субъектам с отрицательным результатом полимеразной цепной реакции (ПЦР) разрешена соответствующая противовирусная профилактика.

16. Активная инфекция гепатита С или известная инфекция вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Субъекты, прошедшие курс лечения от инфекции гепатита С, допускаются, если у них задокументирован устойчивый

вирусологический ответ в течение ≥ 12 недель. Тестирование на ВИЧ не требуется, если это не предписано местным органом здравоохранения.

17. Известно наличие активного туберкулеза.

18. Субъекты с неконтролируемым диабетом. Неконтролируемый диабет определяют по уровню гемоглобина A1c (HbA1c) $\geq 8\%$ или HbA1c от 7% до $< 8\%$ с сопутствующими симптомами диабета (полиурией или полидипсией), которые не имеют иного объяснения.

19. Документально подтвержденные в анамнезе явления, связанное с сосудами головного мозга (инсульт или транзиторная ишемическая атака), нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда или сердечные симптомы, соответствующие III-IV классу по NYHA, в пределах 6 месяцев до введения первой дозы энфортумаба ведотина.

20. Субъекты, которые кормят грудью, беременны или планируют забеременеть с момента подписания информированного согласия до истечения по меньшей мере 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

21. Известная тяжелая (≥ 3 -й степени тяжести) гиперчувствительность к энфортумаба ведотину или к любому вспомогательному средству, содержащемуся в лекарственном составе с энфортумаба ведотином (в том числе гистидину, дигидрату трегалозы и полисорбату 20).

22. Субъекты с активным кератитом или изъязвлениями роговицы. К участию допускаются субъекты с поверхностным точечным кератитом, если, по мнению исследователя, данное заболевание подвергается надлежащему лечению.

23. Другое серьезное лежащее в основе медицинское патологическое состояние, которое, по мнению исследователя, может ухудшить способность субъекта принимать или переносить запланированное лечение и проходить последующее наблюдение.

6.2.2.4 *Количество запланированных субъектов*

[00408] В данном исследовании набирают примерно 58 субъектов. Сюда относятся примерно до 18 субъектов, которые подлежат оценке при увеличении доз, и примерно 40 субъектов, которые подлежат оценке при расширении периода введения доз (до 2 групп примерно по 20 субъектов в каждой).

6.2.2.5 *Схема исследования*

[00409] Данное исследование представляет собой открытое многоцентровое исследование 1-й фазы с увеличением доз и расширением периода введения доз, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, РК и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина у взрослых с NMIBC.

[00410] Данное исследование проводят за 2 части.

[00411] Увеличение доз: примерно 18 субъектов проходят лечение для оценки безопасности, переносимости и содержания в системном кровотоке внутривезикулярного энфортумаба ведотина для определения MTD и/или рекомендуемой дозы.

[00412] Расширение периода введения доз: примерно 40 субъектов (до 2 групп примерно по 20 субъектов в каждой) получают лечение с MTD или рекомендованной дозой для дополнительного изучения характеристик безопасности, РК и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина.

[00413] Увеличение доз и расширение периода введения доз охватывают взрослых пациентов, у которых есть NMIBC и CIS без ответа на лечение посредством VCG (с папиллярным заболеванием или без него). Все субъекты получают исследуемое средство, т. е. энфортумаба ведотин, внутривезикулярным путем. Лечение в ходе исследования происходит в ходе фаз индукции и

поддержания дозы, а после завершения фазы поддержания дозы субъекты входят в период последующего наблюдения.

[00414] В ходе фазы индукции субъекты получают внутривенные инфузии энфортумаба ведотина один раз в неделю (q1wk) в течение 6 недель. Через шесть-8 недель после завершения фазы индукции субъекты проходят свою первую оценку ответа в ходе исследования, после чего они входят в фазу поддержания дозы. В ходе фазы поддержания дозы субъекты получают внутривенный энфортумаба ведотин один раз в месяц в течение в общей сложности 9 доз.

[00415] После завершения фазы поддержания доз субъекты входят в фазу последующего наблюдения в ходе исследования. Оценка ответа опухоли с помощью цистоскопии после стандартного средства лечения (т. е. цистоскопии ± биопсии) и цитологического исследования проводят каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше. После досрочного завершения приема исследуемого лечения по причине стойкости заболевания, рецидива, прогрессирования заболевания или начала последующей противораковой терапии субъекты входят в период последующего наблюдения за продолжительностью жизни, в ходе которого данные о продолжительности жизни и последующей противораковой терапии собирают каждые 6 месяцев (± 2 недели) до момента прекращения последующего наблюдения, отзыва согласия, смертельного исхода или прекращения исследования спонсором, в зависимости от того, что наступит раньше, в течение максимум 5 лет после начала участия в исследовании.

[00416] Оценка ответа с помощью цистоскопии и цитологии мочи должна быть завершена в пределах 14 дней до следующего введения исследуемого

лекарственного средства. Субъекты с патологическими результатами цистоскопии, положительными или патологическими результатами цитологии мочи должны быть подвергнуты дополнительной оценке (например, визуализации, биопсии, исследованию под анестезией) по клиническому усмотрению исследователя.

[00417] При оценке на месяце 12 хода исследования необходима биопсия с картированием мочевого пузыря. При отсутствии видимой опухоли следует провести забор биоптатов из всех квадрантов мочевого пузыря (необходимо минимум 4 биоптата). Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но будет рассмотрена при наличии клинических показаний для оценки эффективности.

[00418] Субъекты, у которых при оценке в любой момент времени в ходе исследования, в том числе в ходе первой оценки через 3 месяца участия в исследовании, обнаружено наличие заболевания T1 с высокой степенью тяжести с CIS или без нее или прогрессирование на следующую стадию заболевания, прекращают прохождение исследуемого лечения. Субъекты с персистирующей CIS или рецидивирующим заболеванием Ta с высокой степенью тяжести на момент первой оценки через 3 месяца участия в исследовании могут продолжить терапию после получения повторного согласия на продолжение исследуемого лечения и должны еще раз пройти оценку через 6 месяцев. Начиная с 6-месячной оценки, любой субъект с персистирующим или рецидивирующим NMIBC с высоким риском развития или прогрессированием заболевания прекращает прохождение исследуемого лечения. Появление, наличие или сохранение опухолей с более низкой степенью тяжести не считаются рецидивом. Субъекты только с опухолями с низкой степенью тяжести продолжают лечение после резекции и гистологического подтверждения успешности.

[00419] Субъекты, которые прекращают исследуемое лечение по причинам, отличным от персистенции, рецидива или прогрессирования заболевания, остаются на фазе последующего наблюдения в ходе исследования.

Увеличение доз

[00420] Системный энфортумаба ведотин в настоящее время одобрен в США в дозе 1,25 мг/кг (до максимальной дозы 125 мг) для лечения пациентов с местно-распространенным или метастатическим раком уротелия, которые ранее принимали ингибитор PD-1 или PD-L1 и платиносодержащую химиотерапию. Профиль безопасности системного энфортумаба ведотина хорошо известен и также оценивается с данным уровнем дозы в многочисленных клинических испытаниях. С учетом данной установленной системной дозы и ее профиля безопасности энфортумаба ведотин в данном исследовании оценивают, начиная с дозы 125 мг, вводимой внутривенным путем.

[00421] В части исследования по увеличению доз оценивают увеличивающиеся концентрации энфортумаба ведотина при 4 запланированных уровнях доз (125, 250, 500 и 750 мг) с объемом инстиляции 25 мл и максимальным временем пребывания в организме 90 минут (или переносимым субъектом временем пребывания в организме, фактическое время пребывания в организме будет зарегистрировано в соответствующей электронной индивидуальной регистрационной карте). В исследование по оценке безопасности, переносимости, системной биодоступности и выявления MTD и/или рекомендуемой дозы внутривенного энфортумаба ведотина набирают примерно до 18 субъектов.

[00422] Увеличение доз проводят с помощью способа модифицированного интервала вероятности токсичности (mTPI). Набор для участия в исследовании происходит по принципу формирования групп.

[00423] Энфортумаба ведотин вводят внутривенным путем q1wk в течение 6 недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение 9 доз во время фазы поддержания дозы в запланированных дозах, представленных в приведенной ниже таблице. Спонсорский комитет и/или комитет по наблюдению за безопасностью (SMC) также могут рекомендовать исследование

более низких и/или промежуточных уровней доз. Если MTD не достигнута, можно изучить уровни дозы, превышающие 750 мг.

Дозолимитирующая токсичность

[00424] Дозолимитирующую токсичность (DLT) оценивают в ходе части исследования по изучению увеличения доз. Период оценки DLT представляет собой время от начала индукции до завершения введения всех 6 индукционных доз плюс 1 неделю. Субъекта будут считать поддающимся оценке по DLT (DE), если он либо перенес DLT, либо получил минимум 5 индукционных доз энфортумаба ведотина.

[00425] DLT определяют как любое из представленных далее состояний, если, по оценке исследователя, оно связано с лечением внутривенным энфортумаба ведотином. Оценку будут проводить в соответствии с CTCAE NCI, версии 5.0:

- возникновение в ходе лечения АЕ 3-й степени тяжести или выше со стороны мочевыводящих путей, таких как гематурия, дизурия, задержка мочи, частота/императивные позывы к мочеиспусканию или спазм мочевого пузыря;
- локальная реакция кожи или слизистых оболочек 3-й степени тяжести и выше в паховой или промежностной области;
- значительная гематурия, приводящая к закупорке тромбом, которая, по оценке исследователя, связана с исследуемым лекарственным средством;
- гематологическая токсичность 3-й степени тяжести или выше (если это увеличение на ≥ 2 степени тяжести по сравнению с исходным уровнем), в том числе:
 - нейтропеническая лихорадка
 - фебрильную нейтропению 3-й степени тяжести определяют как ANC $< 1000/\text{мм}^3$ при однократном измерении температуры, $> 38,3^\circ\text{C}$ (101°F) или стойкой температуре $\geq 38^\circ\text{C}$ ($100,4^\circ\text{F}$) в течение более 1 часа

– фебрильную нейтропению 4-й степени тяжести определяют как ANC $<1000/\text{мм}^3$ при однократном измерении температуры

$>38,3^\circ\text{C}$ (101°F) или стойкой температуре $\geq 38^\circ\text{C}$ ($100,4^\circ\text{F}$) в течение более 1 часа, с опасными для жизни последствиями и показанием срочного вмешательства,

- нейтропения 4-й степени тяжести или тромбоцитопения продолжительностью более 7 дней;

- тромбоцитопения 3-й степени тяжести с кровотечением;

- любые другие негематологические АЕ 3-й степени тяжести или выше, если они не объясняются основным медицинским патологическим состоянием, интеркуррентной болезнью или злокачественным новообразованием;

- связанные с лечением неразрешенные АЕ 2-й степени тяжести длительностью >14 дней;

- любой смертельный исход, явно не обусловленный основным заболеванием или посторонними причинами;

- случаи согласно закону Хая.

[00426] DLT не считаются следующие негематологические случаи токсичности:

- тошнота/рвота или диарея 3-й степени тяжести в течение <72 часов при надлежащей противорвотной и другой поддерживающей терапии;

- утомляемость 3-й степени в течение <1 недели;

- уровень электролитов ≥ 3 -й степени или отклонение другого негематологического лабораторного показателя от нормы, которые длятся <72 часов, не являются клинически осложненными и разрешаются спонтанно или дают ответ на стандартные медицинские вмешательства;

- амилаза или липаза ≥ 3 -й степени, не ассоциированная с симптомами или клиническими проявлениями панкреатита.

Расширение периода введения доз

[00427] Для дополнительного исследования безопасности, переносимости, РК и противоопухолевой активности внутривенного энфортумаба ведотина в 2 когорты с расширением периода введения доз были набраны примерно 40 дополнительных субъектов (примерно по 20 субъектов на группу). Если MTD выявлялась в данной части исследования, посвященной изучению увеличения доз, соответствующий уровень дозы оценивают при расширении периода введения доз. Спонсор, по согласованию с SMC, также может оценить более 1 уровня дозы при расширении периода введения доз, если MTD не была достигнута или если для дальнейшей оценки необходимы разные уровни дозы. Введение данных когорт для изучения расширения периода введения доз определяется спонсором по согласованию с SMC, исходя из совокупной безопасности и активности, наблюдаемой в ходе изучения увеличения доз.

Комитет по наблюдению за безопасностью

[00428] SMC, состоящий из исследователя(-ей) в центре исследования и представителей от спонсора (в том числе медицинского наблюдателя за исследованием, представителя по наблюдению за безопасностью лекарственного средства, ученого-клинициста и специалиста по биостатистике), будет наблюдать за безопасностью субъектов и давать рекомендации по введению доз в ходе увеличения доз и расширения периода введения доз. SMC может рекомендовать дополнительную оценку безопасности заданной дозы (т. е. набор дополнительных субъектов в группу заданной дозы) или исследование уровня дозы, который ниже или является промежуточным по отношению к запланированным уровням доз. SMC также рассматривает совокупные данные по безопасности для выявления проблем безопасности, которые могут возникнуть вследствие совокупного воздействия за пределами промежутка DLT. SMC также может рассматривать данные о противоопухолевой активности для

определения, обосновывает ли профиль пользы-риска продолжение исследования или прекращение исследования для дозы или когорты. SMC дает рекомендации, а окончательные решения принимает спонсор. Дополнительная информация изложена в уставной документации SMC.

6.2.2.6 *Исследуемый продукт, доза и способ введения*

[00429] Энфортумаба ведотин вводят внутривенным путем q1wk в течение 6 недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение 9 доз во время фазы поддержания дозы.

6.2.2.7 *Продолжительность лечения*

[00430] В ходе фазы индукции субъекты получают внутривенные инфузии энфортумаба ведотина q1wk в течение 6 недель. Через шесть-8 недель после завершения фазы индукции субъекты проходят свою первую оценку ответа в ходе исследования, после чего они входят в фазу поддержания дозы. В ходе фазы поддержания дозы субъекты получают внутривенный энфортумаба ведотин один раз в месяц в течение в общей сложности 9 доз.

6.2.2.8 *Оценка ответа/эффективности 112В*

[00431] Оценку ответа от опухоли в исследовании проводят с помощью стандартной цистоскопии (т. е. цистоскопии ± биопсии) и цитологического исследования на этапе скрининга с последующими оценками каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев после этого в течение 5 лет после набора для участия в исследовании.

[00432] Оценка ответа с помощью цистоскопии и цитологии мочи должна быть завершена в пределах 14 дней до следующего введения исследуемого лекарственного средства. Субъекты с патологическими результатами цистоскопии, положительными или патологическими результатами цитологии мочи должны быть подвергнуты дополнительной оценке (например,

визуализации, биопсии, исследованию под анестезией) по клиническому усмотрению исследователя.

[00433] Пока субъект принимает участие в исследовании, проводят ежегодную визуализацию верхних отделов мочеточника по клиническим показаниям.

[00434] При оценке на месяце 12 хода исследования необходима биопсия с картированием мочевого пузыря. При отсутствии видимой опухоли следует провести забор биоптатов из всех квадрантов мочевого пузыря (необходимо минимум 4 биоптата). Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но рассматривается при наличии клинических показаний для оценки эффективности.

[00435] Субъектов считают имеющими CR, если у них присутствуют все представленные далее результаты.

1. Цистоскопия: нормальный внешний вид мочевого пузыря. В случае патологического внешнего вида мочевого пузыря при цистоскопии результаты биопсии должны быть отрицательными или свидетельствовать о низком уровне Та, папиллярном уротелиальном новообразовании любой степени тяжести с низким потенциалом или папилломе любой степени. Если производят случайные биопсии мочевого пузыря, данные биопсии должны давать отрицательный результат или свидетельствовать о заболевании с низкой степенью тяжести.

2. Цитологическое исследование мочи: отрицательный результат.

a. Результаты цитологического исследования мочи, которые не являются убедительными, необходимо оценивать в соответствии с протоколом.

b. Положительный результат цитологического исследования мочи необходимо дополнительно оценить в клинических условиях с помощью цистоскопии ± биопсии и визуализации.

3. Визуализация (при ее проведении): норма или, если обнаружена патология, результаты должны подтверждать CR в мочевом пузыре.

[00436] В связи с внутривезикулярным введением исследуемого средства лечения считается, что у субъекта есть CR, если у него отрицательный результат цистоскопии с результатом цитологического исследования мочи, указывающим на наличие злокачественного новообразования, если рак обнаружен в верхних отделах мочевого пузыря или простатической части уретры, а результаты случайной биопсии мочевого пузыря являются отрицательными.

[00437] Персистирующее заболевание определяют как наличие заболевания CIS с папиллярным заболеванием или без него (Ta/T1 с высокой степенью тяжести).

[00438] Рецидив определяют как повторное появление заболевания с высокой степенью тяжести (Ta, T1 или CIS с высокой степенью тяжести) после начала терапии. Рецидив должен быть подтвержден результатами биопсии.

[00439] Прогрессирование определяют как развитие любого из следующих: заболевания T1 (инвазии в собственный слой), заболевания $\geq T2$ (инвазии в мышцы), лимфатического узла (N1+), отдаленных метастаз (M1) или повышения степени тяжести от низкой до высокой.

[00440] Персистенция, появление или наличие заболевания более низкой степени тяжести не считается рецидивом. Субъекты с рецидивирующим папиллярным заболеванием с низкой степенью тяжести могут быть подвергнуты резекции и продолжить исследование.

6.2.2.9 *Оценки фармакокинетики и иммуногенности*

[00441] В определенные протоколом моменты времени собирают образцы крови для анализов РК и антител к терапевтическим средствам (ATA), а также образцы мочи для анализа РК. Подлежащие оценке дозозависимые РК-параметры крови для энфортумаба ведотина могут включать без ограничения площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC), максимальную концентрацию (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), кажущийся конечный период полужизни (t_{1/2}) и

остаточную концентрацию (Strough). При необходимости оценивают дополнительные анализы.

6.2.2.10 *Оценки фармакодинамики и биомаркеров*

Биомаркеры в опухолевой ткани

[00442] Архивная опухолевая ткань, собранная в пределах 12 месяцев после набора для участия в исследовании, должна быть от всех субъектов, если таковая была (необходимо использовать наиболее последнюю доступную ткань). Если можно получить только свежесрезанные препараты, необходимо минимум 10-15 срезов (если меньше 10, необходимо обратиться к спонсору). Биопсия необходима при обследовании на месяце 12 и должна проводиться по клиническим показаниям в ходе всех остальных оценок. Ткань биоптатов, собранную во время лечения, применяют для оценки биомаркеров.

[00443] Для понимания взаимосвязи между биологическими характеристиками опухолей до лечения и результатами лечения субъекта, исследуют ткани TURBT (биоптаты опухоли). Биоптаты оценивают в отношении наличия специфических фармакодинамических, предиктивных и прогностических биомаркеров в опухоли. Если ткань доступна из полученного стандартным методом биоптата, собранного после набора для участия в исследовании, ее также исследуют в отношении дополнительного выявления биомаркеров ответа, а также механизма действия и устойчивости к лечению.

[00444] Оценки биомаркеров в опухолевой ткани могут включать без ограничения центральную оценку экспрессии нектин-4 и PD-L1 с помощью иммуногистохимического анализа и секвенирования следующего поколения, подтипирование опухоли, анализ опухолевого микроокружения и профилирование соматических мутаций или изменений в генах или РНК, которые обычно изменяются при раке.

Биомаркеры в крови и/или моче

[00445] Первичные эффекты энфортумаба ведотина на опухолевые клетки могут приводить к изменениям состояния активации локальных, опухолеассоциированных и периферических иммунных клеток. Оценки биомаркеров в образцах крови и мочи могут включать без ограничения анализ в кровотоке/бесклеточной опухолевой ДНК, оценку методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) растворимого нектин-4, иммуноанализы биомаркеров в моче и маркеров иммунной функции, в том числе относительное содержание субпопуляций иммунных клеток и цитокинов.

6.2.2.11 *Оценки безопасности*

[00446] Оценки безопасности включают наблюдение и регистрацию АЕ, в том числе серьезных нежелательных явлений (SAE), регистрацию сопутствующих лекарственных препаратов, а также оценки результатов предусмотренного протоколом физикального обследования и лабораторных тестов.

6.2.2.12 *Другие оценки*

[00447] Точку зрения субъекта качественно оценивают с помощью телефонных интервью, длящихся от 45 до 60 минут, охватывающих темы, связанные с опытом и переносимостью лечения. Дополнительная информация, касающаяся тем и вопросов, которые рассматриваются во время данных интервью, описана в документе «Руководство по интервьюированию субъекта (Subject Interview Guide)». Интервью проводят во время увеличения доз и расширения периода введения доз в следующие моменты времени: в конце фазы индукции, при завершении 5 доз во время фазы поддержания дозы и в конце фазы поддержания дозы.

6.2.2.13 *Статистические способы*

[00448] Увеличение доз и выявление MTD проводят с помощью способа mTPI. В конце фазы увеличения доз представляют основанную на модели оценку вероятности DLT вместе с 95% доверительными интервалами. Аналитическая группа по изучению DE включает всех субъектов, получавших лечение при

увеличении доз, которые либо испытали DLT, либо получили по меньшей мере 5 индукционных доз энфортумаба ведотина. Аналитическая группа по изучению DE является основным контингентом для определения MTD.

[00449] Конечные точки по изучению безопасности и противоопухолевой активности обобщают с помощью описательной статистики, основанной на анализе всех получавших лечение субъектов, в том числе всех субъектов, которые получали лечение любым количеством исследуемого лекарственного средства. Частоту CR в любой момент исследования, частоты CR через 3, 6, 12, 18 и 24 месяца и частоту цистэктомии обобщают вместе с точными 95% 2-факторными доверительными интервалами (CI). Продолжительность жизни с CR, PFS и без цистэктомии оценивают с помощью способа Каплана-Мейера.

[00450] Никакой формальной проверки гипотез для когорты для изучения расширения периода введения доз не запланировано. С учетом того, что наблюдаемая частота CR находится в диапазоне от 30% до 50%, 95% и 80%, точные CI с 20 субъектами на когорту подытожены ниже в таблице 11.

Таблица 11

Частота CR	95% точный CI (n=20)	80% точный CI (n=20)
30%	(12%, 54%)	(17%, 47%)
40%	(19%, 64%)	(25%, 57%)
50%	(27%, 73%)	(34%, 66%)

CI = доверительный интервал; CR = полный ответ

6.2.3 Цели

[00451] В данном исследовании оценивают безопасность, переносимость, РК и противоопухолевую активность внутривенного введения энфортумаба ведотина у субъектов с NMIBC. Конкретные цели и соответствующие конечные точки исследования подытожены ниже в таблице 12.

Таблица 12

Основные цели	Соответствующие основные конечные точки
<p>Оценить безопасность и переносимость внутривенного введения энфортумаба ведотина у субъектов с NMIBC</p> <p>Выявить MTD или рекомендуемую дозу внутривенного энфортумаба ведотина у субъектов с NMIBC</p>	<p>Тип, частота возникновения, тяжесть, серьезность АЕ и связь АЕ с исследуемым лечением</p> <p>Тип, частота возникновения и тяжесть отклонений лабораторных показателей от нормы</p> <p>Частота возникновения случаев DLT и кумулятивная безопасность в зависимости от уровня дозы</p>
Вторичные цели	Соответствующие вторичные конечные точки
<p>Оценить PK внутривенного введения энфортумаба ведотина</p> <p>Оценить иммуногенность внутривенного введения энфортумаба ведотина</p> <p>Оценить противоопухолевую активность внутривенного энфортумаба ведотина, измеряемую по частоте CR</p> <p>Оценить продолжительность CR</p> <p>Оценить частоту цистэктомии</p> <p>Оценить продолжительность жизни без прогрессирования</p> <p>Оценить продолжительность жизни без цистэктомии</p>	<p>Оценки избранных PK параметров, в том числе AUC, C_{max}, T_{max}, t_{1/2}, C_{trough}.</p> <p>Частота возникновения случаев АТА</p> <p>Частота CR в любой момент времени в ходе исследования и значения частоты CR через 3, 6, 12, 18 и 24 месяца.</p> <p>Продолжительность CR</p> <p>Частота цистэктомии</p> <p>Продолжительность жизни без прогрессирования</p> <p>Продолжительность жизни без цистэктомии</p>
Исследовательские цели	Соответствующие исследовательские конечные точки
<p>Оценить биомаркеры в отношении ответа, токсичности, фармакодинамики, взаимосвязи PK/PD или устойчивости к энфортумаба ведотину</p> <p>Оценить регистрируемый субъектом опыт и регистрируемую в отчете субъектом</p>	<p>Корреляционный анализ результатов измерения фармакодинамики и оценок PK, ответа, токсичности и резистентности</p> <p>Оценить уровни экспрессии нектин-4 и PD-L1 в опухолевых клетках в качестве исследовательского прогностического</p>

переносимость лечения	биомаркера клинической активности Биомаркеры фармакодинамических эффектов, опосредованных энфортумаба ведотином, в том числе без ограничения уровень внеклеточной опухолевой ДНК, растворимого нектин-4, цитокинов Опыт субъекта по оценке в ходе интервьюирования субъекта
-----------------------	---

АЕ = нежелательное явление; АТА = антитело к исследуемому терапевтическому средству;
 АUC = площадь под кривой зависимости концентрации от времени; C_{max} = максимальная концентрация; CR = полный ответ; C_{trough} = остаточная концентрация лекарственного средства; DLT = дозолIMITирующая токсичность; MTD = максимальная переносимая доза; NMIBC = рак мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой; PD-L1 = лиганд запрограммированной смерти 1; PK = фармакокинетика; PK/PD = фармакокинетика/фармакодинамика; T_{max} = время, при котором возникает максимальная концентрация; t_{1/2} = период полужизни

6.2.4 ПЛАН ИССЛЕДОВАНИЯ

6.2.4.1 *Краткое описание схемы исследования*

[00452] Данное исследование представляет собой открытое многоцентровое исследование 1-й фазы с увеличением доз и расширением периода введения доз, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, PK и противоопухолевой активности внутрИпузырного энфортумаба ведотина у взрослых с NMIBC.

[00453] Данное исследование проводят за 2 части.

- Увеличение доз: примерно 18 субъектов проходят лечение для оценки безопасности, переносимости и содержания в системном кровотоке внутрИпузырного энфортумаба ведотина для определения максимальной переносимой дозы (MTD) и/или рекомендуемой дозы.
- Расширение периода введения доз: примерно 40 субъектов (до 2 групп примерно по 20 субъектов в каждой) получают лечение с MTD или

рекомендованной дозой для дополнительного изучения характеристик безопасности, РК и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина.

[00454] Увеличение доз и расширение периода введения доз охватывают взрослых пациентов, у которых есть NMIBC и CIS без ответа на лечение посредством BCG (с папиллярным заболеванием или без него). Все субъекты получают исследуемое средство, т. е. энфортумаба ведотин, внутривезикулярным путем. Лечение в ходе исследования происходит в ходе фаз индукции и поддержания дозы, а после завершения фазы поддержания дозы субъекты входят в период последующего наблюдения.

[00455] В ходе фазы индукции субъекты получают внутривезикулярные инстилляции энфортумаба ведотина один раз в неделю (q1wk) в течение 6 недель. Через шесть-8 недель после завершения фазы индукции субъекты проходят свою первую оценку ответа в ходе исследования, после чего они входят в фазу поддержания дозы. В ходе фазы поддержания дозы субъекты получают внутривезикулярный энфортумаба ведотин один раз в месяц в течение в общей сложности 9 доз.

[00456] После завершения фазы поддержания доз субъекты входят в фазу последующего наблюдения в ходе исследования. Оценка ответа опухоли с помощью цистоскопии после стандартного средства лечения (т. е. цистоскопии ± биопсии) и цитологического исследования проводят каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше. После досрочного завершения приема исследуемого лечения по причине стойкости заболевания, рецидива, прогрессирования заболевания или начала последующей противораковой терапии субъекты входят в период последующего наблюдения за

продолжительностью жизни, в ходе которого данные о продолжительности жизни и последующей противораковой терапии собирают каждые 6 месяцев (± 2 недели) до момента прекращения последующего наблюдения, отзыва согласия, смертельного исхода или прекращения исследования спонсором, в зависимости от того, что наступит раньше, в течение максимум 5 лет после начала участия в исследовании.

[00457] Оценка ответа с помощью цистоскопии и цитологии мочи должна быть завершена в пределах 14 дней до следующего введения исследуемого лекарственного средства. Субъекты с патологическими результатами цистоскопии, положительными или патологическими результатами цитологии мочи должны быть подвергнуты дополнительной оценке (например, визуализации, биопсии, исследованию под анестезией) по клиническому усмотрению исследователя.

[00458] При оценке на месяце 12 хода исследования необходима биопсия с картированием мочевого пузыря. При отсутствии видимой опухоли следует провести забор биоптатов из всех квадрантов мочевого пузыря (необходимо минимальное количество биоптатов). Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но рассматривается при наличии клинических показаний для оценки эффективности.

[00459] Субъекты, у которых при оценке в любой момент времени в ходе исследования, в том числе в ходе первой оценки через 3 месяца участия в исследовании, обнаружено наличие заболевания T1 с высокой степенью тяжести с CIS или без нее или прогрессирование на следующую стадию заболевания, прекращают прохождение исследуемого лечения. Субъекты с персистирующей CIS или рецидивирующим заболеванием T_a с высокой степенью тяжести на момент первой оценки через 3 месяца участия в исследовании могут продолжить терапию после получения повторного согласия на продолжение исследуемого лечения и должны еще раз пройти оценку через 6 месяцев. Начиная с 6-месячной оценки, любой субъект с персистирующим или рецидивирующим NMIBC с

высоким риском развития или прогрессированием заболевания прекращает прохождение исследуемого лечения. Появление, наличие или сохранение опухолей с более низкой степенью тяжести не считаются рецидивом. Субъекты только с опухолями с низкой степенью тяжести продолжают лечение после резекции и гистологического подтверждения успешности.

[00460] Субъекты, которые прекращают исследуемое лечение по причинам, отличным от персистенции, рецидива или прогрессирования заболевания, остаются на фазе последующего наблюдения в ходе исследования. На ФИГ. 7 представлена общая схема исследования.

[00461] Комитет по наблюдению за безопасностью (SMC), состоящий из исследователя(-ей) в центре исследования и представителей от спонсора (в том числе медицинского наблюдателя за исследованием, представителя по наблюдению за безопасностью лекарственного средства, ученого-клинициста и специалиста по биостатистике), наблюдает за безопасностью субъектов и дает рекомендации по введению доз в ходе увеличения доз и расширения периода введения доз. SMC может рекомендовать дополнительную оценку безопасности заданной дозы (т. е. набор дополнительных субъектов в группу заданной дозы) или исследование уровня дозы, который ниже или является промежуточным по отношению к запланированным уровням доз. SMC также рассматривает совокупные данные по безопасности для выявления проблем безопасности, которые могут возникнуть вследствие совокупного воздействия за пределами промежутка дозолимитирующей токсичности (DLT). SMC также может рассматривать данные о противоопухолевой активности для определения, обосновывает ли профиль пользы-риска продолжение исследования или прекращение исследования для дозы или когорты. SMC дает рекомендации, а окончательные решения будет принимать спонсор. Дополнительная информация изложена в уставной документации SMC.

(i) Когорта с увеличением доз

[00462] В исследовании увеличения доз набирают примерно 18 субъектов.

[00463] Увеличение доз производят с помощью способа модифицированного интервала вероятности токсичности (mTPI) (Ji 2010) для оценки безопасности и переносимости, а также для выявления MTD и/или рекомендуемой дозы внутривенного энфортумаба ведотина. Для определения рекомендуемой дозы и графика лечения используют результаты анализов безопасности, РК, фармакодинамики, биомаркеров и предварительную противоопухолевую активность.

[00464] Способ mTPI предусматривает использование байесовской модели для расчета апостериорных вероятностей 3 интервалов, которые отражают относительное расстояние между степенью токсичности каждого уровня дозы и целевой степенью DLT. Определяют правила принятия решения о введении доз для целевой степени DLT, равной 25%, с запасом в 5%. 3 интервалами являются следующие: (0%, 20%), (20%, 30%) и (30%, 100%), а соответствующие правила принятия решения о введении дозы имеют следующий вид:

1. увеличить, если степень DLT текущей дозы по всей вероятности составляет <20%,
2. сохранить без изменений, если степень DLT текущей дозы по всей вероятности составляет от 20% до 30%,
3. уменьшить, если степень DLT текущей дозы по всей вероятности составляет >30%.

[00465] Решения по подбору дозы представлены в таблице 13. «E» означает увеличение дозы, «S» означает сохранение той же дозы, а «D» означает уменьшение дозы. Решение «DU» означает, что текущий уровень дозы неприемлем вследствие высокой токсичности. Дозу определяют как имеющую неприемлемую токсичность, если апостериорная вероятность того, что степень DLT выше 25%, превышает 95%.

Таблица 13. Развернутая таблица результатов определения дозы для схемы методом mTPI

	Количество субъектов, поддающихся оценке по DLT, при текущей дозе														
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
1	S	S	S	S	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
2	DU	D	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E	E	
3		DU	DU	DU	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
4			DU	DU	DU	DU	DU	D	S	S	S	S	S	S	
5				DU	DU	DU	DU	DU	DU	D	S	S	S	S	
6					DU	D	S								
7						DU									
8							DU								
9								DU							
10									DU	DU	DU	DU	DU	DU	
11										DU	DU	DU	DU	DU	
12											DU	DU	DU	DU	
13												DU	DU	DU	
14													DU	DU	
15														DU	

D = уменьшение до следующей более низкой дозы; DLT = дозолIMITирующая токсичность; DU = текущая доза является неприемлемо токсичной; E = увеличение до следующей более высокой дозы; mTPI = модифицированный интервал вероятности токсичности; S = сохранение текущей дозы.

[00466] Набор для участия в исследовании происходит по принципу формирования групп. Решения об увеличении дозы и последующем размере когорты (минимум из 2 субъектов) принимаются спонсором по согласованию с SMC после комплектации каждой когорты. Субъекты в текущей когорте должны проходить наблюдение в течение всего периода исследования DLT, прежде чем будет задействована следующая когорта. В качестве меры предосторожности для первых 2 субъектов в исследовании предусмотрен 72-часовой период наблюдения после того, как каждый субъект получит свою первую дозу исследуемого лекарственного средства, прежде чем можно будет ввести дозу

следующему субъекту. При дозах выше уровня дозы 1 необходим 72-часовой период наблюдения после того, как первый субъект получит первую внутривенную дозу энфортумаба ведотина, прежде чем последующим субъектам введут дозу с данным уровнем дозы. Субъектов, которые считаются не поддающимися оценке по DLT, заменяют на других. При расчетной MTD наблюдают как минимум за 6 субъектами, поддающимися оценке по DLT (DE), до прекращения увеличения дозы. MTD оценивают на основе данных, полученных от всех субъектов по всем оцениваемым дозам. Если MTD не достигнута, для определения рекомендуемой дозы используют данные по безопасности, PK, фармакодинамике и биомаркерам, а также предварительной противоопухолевой активности.

[00467] Уменьшение дозы до более низкого или промежуточного уровня доз осуществляется спонсором по согласованию с SMC в любой момент времени.

[00468] В части исследования по увеличению доз оценивают увеличивающиеся концентрации энфортумаба ведотина при 4 запланированных уровнях доз (125, 250, 500 и 750 мг; см. таблицу 3) с объемом инстиляции 25 мл и максимальным временем пребывания в организме 90 минут (или переносимым субъектом временем пребывания в организме, фактическое время пребывания в организме регистрируют в соответствующей электронной индивидуальной регистрационной карте [eCRF]). Для участия в части исследования увеличения доз набирают примерно до 18 субъектов. Энфортумаба ведотин вводят внутривенным путем q1wk в течение 6 недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение 9 доз во время фазы поддержания дозы в запланированных дозах, представленных в таблице 14. Спонсорский комитет и/или SMC также могут рекомендовать исследование более низких и/или промежуточных уровней доз. Если MTD не достигнута, изучают уровни дозы, превышающие 750 мг.

Таблица 14. Схема увеличения доз

Уровень дозы ^a	Доза (мг)
1	125

2	250
3	500
4	750

q1wk = раз в неделю; SMC = комитет по наблюдению за безопасностью; частота введения доз: индукция q1wk в течение 6 недель; поддержание дозы: раз в месяц в течение 9 доз; объем инстиляции 25 мл.

а Исходя из новых клинических данных, SMC может рекомендовать провести исследование более низких или промежуточных доз.

(ii) Когорты расширения периода введения доз

[00469] Для дополнительного исследования безопасности, переносимости, PK и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина в 2 когорты с расширением периода введения доз были набраны примерно 40 дополнительных субъектов (примерно по 20 субъектов на группу). Если MTD выявлялась в данной части исследования, посвященной изучению увеличения доз, соответствующий уровень дозы оценивают при расширении периода введения доз. Спонсор, по согласованию с SMC, также может оценить более 1 уровня дозы при расширении периода введения доз, если MTD не была достигнута или если для дальнейшей оценки необходимы разные уровни дозы. Введение данных когорт для изучения расширения периода введения доз определяется спонсором по согласованию с SMC, исходя из совокупной безопасности и активности, наблюдаемой в ходе изучения увеличения доз.

(iii) Продолжительность лечения

[00470] В ходе фазы индукции субъекты получают внутривезикулярные инстиляции энфортумаба ведотина q1wk в течение 6 недель. Через шесть-8 недель после завершения фазы индукции субъекты проходят свою первую оценку ответа в ходе исследования, после чего они входят в фазу поддержания дозы. В ходе фазы поддержания дозы субъекты получают внутривезикулярный энфортумаба ведотин один раз в месяц в течение в общей сложности 9 доз.

(iv) Дозолимитирующая токсичность

[00471] DLT оценивают в ходе части исследования по изучению увеличения доз. Период оценки DLT представляет собой время от начала индукции до завершения введения всех 6 индукционных доз плюс 1 неделю. Субъекта считают DE-субъектом, если он либо перенес DLT, либо получил минимум 5 индукционных доз энфортумаба ведотина.

[00472] DLT определяют как любое из представленных далее состояний, если, по оценке исследователя, оно связано с лечением внутривенным энфортумаба ведотином. Определение степени тяжести производят согласно Общим терминологическим критериям нежелательных явлений Национального института онкологии (CTCAE NCI), версии 5.0:

- возникновение в ходе лечения АЕ 3-й степени тяжести или выше со стороны мочевыводящих путей, таких как гематурия, дизурия, задержка мочи, частота/императивные позывы к мочеиспусканию или спазм мочевого пузыря;
- локальная реакция кожи или слизистых оболочек 3-й степени тяжести и выше в паховой или промежностной области;
- значительная гематурия, приводящая к закупорке тромбом, которая, по оценке исследователя, связана с исследуемым лекарственным средством;
- гематологическая токсичность 3-й степени тяжести или выше (если это увеличение на ≥ 2 степени тяжести по сравнению с исходным уровнем), в том числе:
 - нейтропеническая лихорадка
 - - фебрильную нейтропению 3-й степени тяжести определяют как абсолютное количество нейтрофилов (ANC)
 - $< 1000/\text{мм}^3$ при однократном измерении температуры $> 38,3^\circ\text{C}$ (101°F) или стойкой температуре $\geq 38^\circ\text{C}$ ($100,4^\circ\text{F}$) в течение более 1 часа
 - - фебрильную нейтропению 4-й степени тяжести определяют как

ANC < 1000/мм³ при однократном измерении температуры > 38,3°C (101°F) или стойкой температуре ≥ 38°C (100,4°F) в течение более 1 часа с угрожающими для жизни последствиями и показанием для срочного вмешательства

- нейтропения 4-й степени тяжести или тромбоцитопения продолжительностью более 7 дней;
- тромбоцитопения 3-й степени тяжести с кровотечением;
- любые другие негематологические АЕ 3-й степени тяжести или выше, если они не объясняются основным медицинским патологическим состоянием, интеркуррентной болезнью или злокачественным новообразованием;
- связанные с лечением неразрешенные АЕ 2-й степени тяжести длительностью > 14 дней;
- любой смертельный исход, явно не обусловленный основным заболеванием или посторонними причинами;
- случаи согласно закону Хая.

[00473] В качестве DLT не считаются следующие негематологические случаи токсичности:

- тошнота/рвота или диарея 3-й степени тяжести в течение < 72 часов при надлежащей противорвотной и другой поддерживающей терапии;
- утомляемость 3-й степени в течение < 1 недели;
- уровень электролитов ≥ 3-й степени или отклонение другого негематологического лабораторного показателя от нормы, которые длятся < 72 часов, не являются клинически осложненными, разрешаются спонтанно или дают ответ на стандартные медицинские вмешательства;
- амилаза или липаза ≥ 3-й степени, не ассоциированная с симптомами или клиническими проявлениями панкреатита.

(v) Критерии остановки

(a) Приостановка набора для участия в исследовании на уровне когорты

[00474] Если спонсор считает, что смертельный случай связан с приемом энфортумаба ведотина, набор для участия в исследовании приостанавливают на уровне данной дозы и всех более высоких доз до тех пор, пока:

1. данный случай рассматривается исследователем, спонсором, а также SMC, и
2. спонсор не уведомил соответствующие регуляторные органы о результатах оценки безопасности и обосновании возобновления набора для участия в исследовании в затронутые когорты, а также не получил разрешение на возобновление, если того требуют местные нормы.

(b) Прекращение набора для участия в исследовании на все время исследования

[00475] Спонсор прекращает набор для участия в исследовании на все время исследования, если общий баланс пользы и риска считается отрицательным.

[00476] На протяжении всего исследования за безопасностью постоянно наблюдает спонсор и SMC с возможностью прекращения набора для участия в исследовании, если частота возникновения и/или тяжесть токсичности приводит к тому, что для исследуемого контингента оценка соотношения риска и пользы является неприемлемой. Спонсор проводит консультации с SMC для вынесения решения, разрешить ли субъектам, уже получающим лечение, продолжить, рассмотреть возможность модификаций протокола для продолжения набора для участия в исследовании или завершить исследование.

[00477] Если набор для участия в исследовании прекращен из соображений безопасности, его можно возобновить только после внесения соответствующих изменений и уведомления регуляторных органов с разрешением на возобновление, если того требуют местные нормы.

(vi) Окончание исследования

[00478] Исследование закрывают примерно через 5 лет после набора для участия в нем последнего субъекта или когда ни один субъект не остается под последующим наблюдением, в зависимости от того, что произойдет раньше. Кроме того, спонсор может прекратить исследование в любое время.

(vii) Комитет по наблюдению за безопасностью

[00479] SMC наблюдает за безопасностью энфортумаба ведотина на протяжении всей фазы увеличения дозы и расширения периода введения доз. SMC состоит из исследователя(-ей) в центре исследования и представителей от спонсора (в том числе медицинского наблюдателя за исследованием, представителя по наблюдению за безопасностью лекарственного средства, ученого-клинициста и специалиста по биостатистике). Комитет наблюдает за безопасностью участников в данном исследовании посредством регулярных и/или специальных совещаний, которые включают анализ данных, касающихся решений об увеличении дозы и случаев токсичности, возникающих в ходе лечения (TE). Как минимум, совещания SMC проводят во время части исследования, посвященной увеличению доз, после того, как все субъекты в когорте завершили период оценки DLT. Для оценки безопасности и определения DLT SMC рассматривает клинические данные от набранных для участия в исследовании субъектов. SMC дает рекомендации по уровню дозы и размеру когорты в сочетании со сводной таблицей правил принятия решений по mTPI. Для участия в исследовании набирают множественные когорты на уровне дозы в соответствии с моделью mTPI. SMC примерно раз в квартал на протяжении всего расширения периода введения доз также проводит совещания для рассмотрения совокупных данных субъектов.

[00480] Помимо определения DLT и рекомендаций по увеличению доз, SMC, в зависимости от обстоятельств, в ходе исследования может дать одну или несколько из следующих рекомендаций:

- произвести дополнительную оценку безопасности при заданной дозе,
- произвести оценку альтернативных подходов к введению исследуемого лекарственного средства (например, увеличение продолжительности введения или необходимость премедикации перед введением),
- произвести оценку более низкого или промежуточного уровня дозы во время увеличения доз,
- дать рекомендацию по подлежащей(-им) оценке дозе(-ам) в когортах с расширением периода введения доз, исходя из активности и переносимости уровней доз в ходе увеличения доз,
- дать рекомендацию по монотерапии и графику внутрипузырного введения энфортумаба ведотина на основе данных о безопасности и активности,
- если MTD не достигнута, дать оценку более высоких уровней доз в ходе увеличения доз.

[00481] Дополнительная информация изложена в уставной документации SMC.

6.2.4.2 *Рассмотрение и обоснование схемы исследования*

[00482] Данное первое исследование на людях (FII) представляет собой исследование 1-й фазы с увеличением доз и расширением периода введения доз для оценки безопасности и переносимости внутрипузырного введения энфортумаба ведотина, вводимого q1wk в течение 6 недель во время фазы индукции и ежемесячно в общей сложности 9 доз во время фазы поддержания дозы, а также для оценки MTD и/или определения рекомендуемой дозы и графика лечения у субъектов с NMIBC. Первоначальная клиническая разработка внутрипузырного энфортумаба ведотина предусматривает его оценку на субъектах, которые не дают ответ на BCG и не имеют подходящих стандартных вариантов терапии (например, для них недопустима радикальная цистэктомия или они отказываются от нее) и, по мнению лечащего врача, являются кандидатами на внутрипузырное введение энфортумаба ведотина.

[00483] Увеличение доз используют для оценки MTD и/или определения рекомендуемой дозы внутривезикулярного энфортумаба ведотина. После завершения части с увеличением доз и демонстрации первоначальной безопасности лекарственного средства для участия в исследовании набирают до 2 когорты по изучению расширения периода введения доз примерно по 20 субъектов в каждой для дополнительной оценки безопасности и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина. Когорты по изучению расширения периода введения доз позволяют собрать дополнительную информацию о безопасности, переносимости, РК и противоопухолевой активности внутривезикулярного энфортумаба ведотина. Данная информация послужит основой для дальнейшей разработки внутривезикулярного энфортумаба ведотина.

(i) Обоснование использования mTPI в ходе увеличения доз

[00484] Для данного исследования был выбран способ mTPI увеличения доз по причине его потенциальных преимуществ перед традиционным подходом «3+3» для определения доз. К данным преимуществам относятся возможность нацеливаться на любую заранее заданную частоту DLT, лечение меньшего количества субъектов дозой, превышающей MTD, тем самым повышая безопасность и обеспечивая гибкие размеры когорты (Ji 2010). Для оценки MTD с целью повышения точности оценки способ mTPI также предусматривает использование информации от всех субъектов, получающих лечение на всех уровнях доз.

(ii) Способ распределения субъектов по группам лечения

[00485] Во время увеличения доз распределение субъектов по уровню дозы определяется правилами принятия решений mTPI, проиллюстрированными в таблице 13, и оно происходит после одобрения спонсором набора субъектов для участия в исследовании.

[00486] Во время расширения периода введения доз набирают субъектов для участия в исследовании в максимум 2 когорты примерно по 20 субъектов в каждой. Если MTD выявлялась в данной части исследования, посвященной изучению увеличения доз, соответствующий уровень дозы оценивают при расширении периода введения доз. Спонсор, по согласованию с SMC, также может оценить более 1 уровня дозы при расширении периода введения доз, если MTD не была достигнута или если для дальнейшей оценки необходимы разные уровни дозы. Введение данных когорт для изучения расширения периода введения доз будет определяться спонсором по согласованию с SMC, исходя из совокупной безопасности и активности, наблюдаемой в ходе изучения увеличения доз.

[00487] Медицинское наблюдение позволяет оценить безопасность внутривезикулярного введения энфортумаба ведотина на протяжении всего испытания и, по соображениям безопасности, может игнорировать модель распределения субъекта по конкретному уровню дозы.

(iii) Обоснование выбора доз

[00488] Системный энфортумаба ведотин в настоящее время одобрен в США в дозе 1,25 мг/кг (до максимальной дозы 125 мг) для лечения пациентов с местнораспространенным или метастатическим UC, которые ранее принимали ингибитор PD-1 или PD-L1 и платиносодержащую химиотерапию в режиме с добавлением неоадьюванта/адьюванта, для лечения местнораспространенного или метастатического рака, а также его в данный момент оценивают в данной дозе в клинических испытаниях. Профиль безопасности энфортумаба ведотина на данном уровне дозы был хорошо изучен в испытаниях на системных солидных опухолях и, в частности, при раке мочевого пузыря (EV-101, EV-201, EV-301; более подробную информацию см. в Брошюре исследователя). Учитывая доклинические данные о переносимости, низкой системной абсорбции и известный профиль безопасности системного энфортумаба ведотина в дозе

125 мг, в данном исследовании будут оценивать энфортумаба ведотин, начиная с дозы 125 мг, вводимой внутривенно.

(iv) Маскирование и демаскирование данных исследования

[00489] Это открытое исследование.

6.2.5 ИССЛЕДУЕМЫЙ КОНТИНГЕНТ

[00490] Чтобы иметь право на участие в данном исследовании, субъекты должны соответствовать всем критериям отбора для участия в исследовании. Критерии отбора не могут быть отклонены исследователем и подлежат пересмотру в случае аудита на соответствие надлежащей клинической практике и/или проверки регуляторным органом здравоохранения.

6.2.5.1 *Критерии включения и исключения*

[00491] См. раздел 6.2.2.

6.2.5.2 *Репродуктивный потенциал*

[00492] Человеком с репродуктивным потенциалом является любое лицо, родившееся женщиной, у которой начались менструации и которая не подвергалась хирургической стерилизации (например, гистерэктомии, двусторонней сальпингэктомии, двусторонней овариэктомии) или не вошла в фазу менопаузы. С клинической точки зрения менопауза определяется как 12-месячное отсутствие менструаций у человека старше 45 лет при отсутствии других биологических, физиологических или фармакологических причин.

[00493] Человеком, который может стать отцом детей, является любой человек, имеющий при рождении мужской пол, у которого есть семенники и который не подвергался хирургической стерилизации (например, вазэктомии с последующим клиническим тестом, доказывающим эффективность процедуры).

6.2.5.3 *Отстранение субъектов от исследуемого лечения или оценок*

[00494] Спонсор исследования должен быть уведомлен, если субъекта исключают из исследуемого лечения или исследования. Причина(-ы) исключения субъекта должна(-ы) быть задокументирована(-ы) в медицинских записях субъекта и в индивидуальной регистрационной карте (CRF).

(i) Досрочное завершение исследуемого лечения

[00495] Исследуемое лечение субъекта прекращают по любой из следующих причин:

- завершенное лечение по протоколу;
- персистирующее, рецидивирующее или прогрессирующее заболевание
 - субъекты, у которых при оценке в любой момент времени в ходе исследования, в том числе в ходе первой оценки через 3 месяца участия в исследовании, обнаружено наличие заболевания T1 с высокой степенью тяжести с CIS или без нее, прекращают прохождение исследуемого лечения,
 - субъекты с персистирующей CIS или рецидивирующим заболеванием Ta с высокой степенью тяжести на момент первой оценки через 3 месяца участия в исследовании могут продолжить терапию после получения повторного согласия и продолжения исследуемого лечения и должны еще раз пройти оценку через 6 месяцев,
 - начиная с 6-месячной оценки, любой субъект с персистирующим или рецидивирующим NMIBC с высоким риском развития или прогрессированием заболевания прекращает прохождение исследуемого лечения;
- появление, наличие или сохранение опухолей с более низкой степенью тяжести не будут считаться рецидивом; субъекты только с опухолями с низкой степенью тяжести продолжают лечение после резекции и гистологического подтверждения успешности;
- нежелательное явление (AE);

- беременность;
- решение исследователя;
- решение субъекта, не АЕ;
- прекращение исследования по решению спонсора;
- другое, не АЕ.

[00496] Субъекты, прекратившие прохождение исследуемого лечения, останутся в исследовании для последующего наблюдения, если они не отзовут свое согласие.

(ii) Рекомендации по досрочному завершению лечения, связанные с безопасностью для печени

[00497] В отсутствие объяснения повышенных результатов тестов функции печени, таких как вирусный гепатит, ранее существовавшее или острое заболевание печени или воздействие других средств, ассоциированных с повреждением печени, субъект прекращает прохождение исследуемого лечения. Исследователь может определить, что продолжение прохождения исследуемого лечения не в лучших интересах субъекта. Досрочное завершение лечения следует рассмотреть в следующих случаях:

- ALT или AST $>8 \times$ ULN,
- ALT или AST $>5 \times$ ULN в течение более 2 недель,
- ALT или AST $>3 \times$ ULN и общий билирубин $>2 \times$ ULN или INR $>1,5$ (если INR-тестирование применимо/поддается оценке),
- ALT или AST $>3 \times$ ULN с появлением симптомов, свидетельствующих о повреждении печени (например, боль или болезненность в правом подреберье), и/или эозинофилии ($>5\%$).

[00498] Данные рекомендации по досрочному завершению лечения основаны на Руководстве FDA для промышленности (Лекарственное повреждение печени: дорегистрационная клиническая оценка, июль 2009 года (Drug-Induced Liver Injury: Premarketing Clinical Evaluation, July 2009)). Рекомендации представляют собой основное руководство для исследователя, основанное на накопленном клиническом опыте работы с разрабатываемыми лекарственными средствами, и не являются специализированными для клинического опыта работы с энфортумаба ведотином.

(iii) Исключение субъекта из исследования

[00499] Любого субъекта исключают из исследования по любой из следующих причин:

- завершенное исследование по протоколу;
- отзыв субъектом согласия;
- прекращение исследования по решению спонсора;
- прекращение последующего наблюдения;
- смертельный исход;
- другое.

6.2.6 **ВАРИАНТЫ ЛЕЧЕНИЯ**

6.2.6.1 *Вводимые средства лечения*

[00500] Все субъекты получают исследуемое средство, т.е. энфортумаба ведотин, в данном протоколе внутривенным путем.

6.2.6.2 *Исследуемый продукт*

[00501] Подробная информация, описывающая получение, введение и хранении энфортумаба ведотина, представлена в фармацевтических инструкциях.

(i) Описание

[00502] Энфортумаба ведотин получают путем конъюгации химического промежуточного соединения, которое содержит как ММАЕ, так и линкерные субъединицы, с цистеиновыми остатками антитела. Полученный ADC содержит в среднем 3,8 молекулы лекарственного средства на антитело. Лекарственный продукт энфортумаба ведотин представляет собой стерильный, не содержащий консервантов, лиофилизированный порошок белого-беловатого цвета, который необходимо ресуспендировать для внутривенного введения. Энфортумаба ведотин поставляется во флаконах с однократной дозой по 30 мг.

(ii) Доза и способ введения

[00503] Энфортумаба ведотин вводят внутривенным путем q1wk в течение 6 недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение 9 доз во время фазы поддержания дозы.

[00504] В части исследования по увеличению доз оценивают увеличивающиеся концентрации энфортумаба ведотина при 4 запланированных уровнях доз (125, 250, 500 и 750 мг) с объемом инстиляции 25 мл и максимальным временем пребывания в организме 90 минут (или переносимым субъектом временем пребывания в организме, фактическое время пребывания в организме будет зарегистрировано в соответствующей eCRF).

(iii) Модификации дозы

[00505] Отсрочка введения дозы или модификации дозы в связи с токсичностью должны производиться исследователем по согласованию с медицинским наблюдателем индивидуально для каждого субъекта. Во время части исследования по увеличению доз субъекты прекращают прохождение

исследуемого лечения, если они испытывают какую-либо токсичность, соответствующую критериям DLT, в течение периода оценки DLT, если только токсичность не контролируется должным образом, исследователь считает возобновление исследуемого лечения целесообразным и получено одобрение медицинского наблюдателя. При принятии решения в учет принимают тип и степень тяжести наблюдаемого АЕ.

[00506] В случае отсрочки введения дозы субъекты должны продолжать проходить оценки ответа каждые 3 месяца в соответствии со стандартом лечения и Графиком мероприятий.

(a) Фаза индукции

[00507] Во время фазы индукции с одобрения медицинского наблюдателя допускаются отсрочки введения дозы до 14 дней. Во время фазы индукции исследователь может пропустить лишь 1 запланированное графиком индукционное лечение по причине неразрешенной токсичности. Субъектов, которым необходимо пропустить более 1 запланированного графиком индукционного лечения, исключают из исследуемого лечения.

[00508] Субъекты, которые испытывают АЕ, соответствующие критериям DLT во время фазы индукции, не должны получать дальнейшее лечение внутривенным инфузционным эфортумаба ведотином, если только токсичность не контролируется должным образом, исследователь считает возобновление внутривенного введения эфортумаба ведотина целесообразным и медицинский наблюдатель одобряет возобновление. При принятии решения в учет принимают тип и степень тяжести наблюдаемого АЕ.

[00509] Субъекты могут возобновить лечение в той же дозе или в уменьшенной дозе после обсуждения с медицинским наблюдателем. Если субъект продолжает лечение после АЕ, которое квалифицируется как DLT, и то же АЕ повторяется, лечение должно быть прекращено окончательно. Субъекты, которые испытывают АЕ, соответствующие критериям окончательного

досрочного завершения внутривезикулярного энфортумаба ведотина, не могут возобновить исследуемое лечение, в том числе в более низкой или модифицированной дозе.

[00510] При втором возникновении того же АЕ 3-й степени тяжести введение внутривезикулярного энфортумаба ведотина следует прекратить окончательно.

[00511] Свяжитесь с медицинским наблюдателем в случае возникновения любых других не связанных с лечением АЕ, при которых необходима отсрочка введения дозы ≥ 14 дней.

(b) Фаза поддержания дозы

[00512] В ходе фазы поддержания дозы субъекты с неразрешенными связанными с лечением АЕ 2-й степени тяжести или выше, при которых необходима отсрочка введения дозы, могут задержать введение запланированной графиком поддерживающей дозы до тех пор, пока АЕ не вернется к 1-й степени тяжести или к степени тяжести на исходном уровне. Отсрочки лечения >28 дней в случае любых неразрешенных АЕ следует обсудить с медицинским наблюдателем с целью определения, есть ли постоянная клиническая польза для субъекта продолжать участие в испытании. Введение поддерживающих доз следует отсрочить, но не пропускать. Отсрочка введения 2 последовательных поддерживающих доз в связи со связанной с лечением неустранимой токсичностью не допускается, а лечение должно быть прекращено окончательно.

[00513] Субъекты могут возобновить лечение в той же дозе или в уменьшенной дозе после обсуждения с медицинским наблюдателем. Если субъект продолжает лечение после АЕ, которое квалифицируется как DLT, и то же АЕ повторяется, лечение должно быть прекращено окончательно. Субъекты, которые испытывают АЕ, соответствующие критериям окончательного досрочного завершения внутривезикулярного энфортумаба ведотина, не могут

возобновить исследуемое лечение, в том числе в более низкой или модифицированной дозе.

[00514] При втором возникновении того же АЕ 3-й степени тяжести введение внутривенного энфортумаба ведотина будет прекращено окончательно.

(с) Модификации доз в случае связанной с лечением токсичностью

[00515] Рекомендации по модификации доз в случае связанной с энфортумаба ведотином гематологической и негематологической токсичности представлены соответственно в таблице 15 и таблице 16.

Таблица 15. Рекомендуемые модификации доз в случае ассоциированной с энфортумаба ведотином гематологической токсичности

1-я степень тяжести	2-я степень тяжести	3-я степень тяжести	4-я степень тяжести
Продолжать с тем же уровнем дозы.	Продолжать с тем же уровнем дозы. В случае тромбоцитопении 2-й степени тяжести приостановить дозу до тех пор, пока токсичность не станет \leq 1-й степени тяжести или не вернется к исходному уровню, затем возобновить лечение с тем же уровнем дозы.	Прекратить лечение.	Прекратить лечение.

Таблица 16. Рекомендуемые модификации доз в случае ассоциированной с энфортумаба ведотином негематологической токсичности

Токсичность	1-я степень тяжести	2-я степень тяжести	3-я степень тяжести	4-я степень тяжести
Кожная сыпь, не связанная со случайным местным воздействием мочи или лекарственного средства	Можно продолжать с тем же уровнем дозы.	В случае кожной сыпи 2-й степени тяжести рассмотреть возможность приостановки энфортумаба ведотина до тех пор, пока токсичность не достигнет 1-й степени тяжести или не вернется к исходному уровню, а затем возобновить лечение с тем же	Прекратить лечение.	Прекратить лечение.

Токсичность	1-я степень тяжести	2-я степень тяжести	3-я степень тяжести	4-я степень тяжести
		уровнем дозы.		
Офтальмологические явления	В случаях офтальмологических явлений 1-й степени тяжести офтальмологические симптомы и/или изменения зрения, если таковые выявлены, должны быть оценены квалифицированным оптометристом или офтальмологом.	Прекратит ь лечение.	Прекратить лечение.	Прекратить лечение.
Нейропатия	Можно продолжать с	Прекратит ь лечение.	Прекратить лечение.	Прекратить лечение.
Гипергликемия	тем же уровнем дозы.	Можно продолжат ь с тем же уровнем дозы.	В случае гипергликемии 3-й степени тяжести или уровне глюкозы в крови >250 мг/дл приостановить лечение энфортумаба ведотином.	В случае гипергликемии 4-й степени тяжести или уровня глюкозы в крови >500 мг/дл, которые считаются связанными с исследуемым лечением, прекратить лечение энфортумаба

Токсичность	1-я степень тяжести	2-я степень тяжести	3-я степень тяжести	4-я степень тяжести
			Возобновить лечение, как только гипергликемия/глюкоза в крови достигнет ≤ 250 мг/дл и субъект станет стабильным с клинической и метаболической точек зрения.	ведотинном и провести полную оценку гипергликемии для определения основного диагноза. При уменьшении гипергликемии/повышенного уровня глюкозы в крови до ≤ 250 мг/дл введение доз можно возобновить под тщательным наблюдением после консультации с медицинским наблюдателем.

На протяжении всего исследуемого лечения электролитные дисбалансы/отклонения лабораторных показателей от нормы 3/4-й степени тяжести, за исключением гипергликемии, которые не ассоциированы с клиническими последствиями и корректируются приемом добавок/соответствующим контролем в пределах 72 часов после их начала, не нуждаются в досрочном завершении лечения (например, гипонатриемия 4-й степени тяжести).

(iv) Хранение и обращение

[00516] При хранении флаконов и растворов, содержащих энфортумаба ведотин, необходимо установить температуру охлаждения на уровне 2-8°C. Доступ к контролируемому месту хранения должен быть только у фармацевта, исследователя или должным образом назначенного лица. Перед введением исследуемое лекарственное средство необходимо ресуспендировать.

[00517] Влияние света на исследуемое лекарственное средство не было оценено, поэтому рекомендуется до момента применения защищать от света

флаконы с лиофилизированным порошком энфортумаба ведотина, ресуспендированным лекарственным продуктом и/или растворами для введения доз.

[00518] Не встряхивать флаконы с ресуспендированным исследуемым лекарственным средством.

[00519] Любые частично использованные флаконы или приготовленные растворы для введения дозы должны быть уничтожены в исследовательском центре в соответствии с институциональными процедурами утилизации лекарственных средств. Неиспользованные флаконы должны быть уничтожены в исследовательском центре или возвращены спонсору после полученного от спонсора разрешения.

6.2.6.3 *Обязательная премедикация и постмедикация*

[00520] Для внутрипузырного энфортумаба ведотина не нужны обязательные премедикации или постмедикации.

[00521] Считается, что применение местных кожных защитных мазей перед инстилляцией вокруг наружных половых органов позволяет предупредить контакт или раздражение кожи.

[00522] Субъектов, особенно женщин, следует проинструктировать о необходимости мытья половых органов после каждого мочеиспускания в день инстилляций и, при необходимости, применения барьерных мазей.

6.2.6.4 *Сопутствующая терапия*

[00523] Все варианты лечения, которые исследователь считает необходимыми для здоровья субъекта, применяют по усмотрению исследователя в соответствии с общественными стандартами медицинской помощи, за исключением тех лекарственных препаратов, которые установлены как запрещенные.

[00524] Все применяемые сопутствующие лекарственные препараты и продукты на основе крови регистрируют, начиная с дня 1 (до введения дозы) и в течение всего периода отчетности по безопасности. Любой сопутствующий лекарственный препарат, назначаемым в связи с АЕ, связанным с протоколом исследования, необходимо регистрировать с момента получения информированного согласия.

(i) Обязательная сопутствующая терапия

[00525] Обязательные сопутствующие средства терапии не нужны.

(ii) Допустимая сопутствующая терапия

[00526] Сопутствующий продолжительный преднизолон (или его эквивалент) применяют в дозе ≤ 20 мг/сутки. Более высокие дозы преднизолона (или его эквивалента) разрешены в течение ограниченного периода времени для лечения острых патологических состояний, возникающих в ходе исследования по медицинским показаниям. Разрешено применение противорвотных средств.

[00527] Субъекты, которые принимают сильные ингибиторы цитохрома P450 (CYP) 3A4 или ингибиторы P-гликопротеина (P-gp) одновременно с энфортумаба ведотином, должны находиться под тщательным наблюдением на предмет неблагоприятных реакций.

[00528] Разрешена стандартная профилактика с помощью вакцин; рекомендуется, чтобы применяемые вакцины не содержали живых микроорганизмов.

[00529] Субъекты с положительным поверхностным антигеном гепатита В и/или коровыми антителами к гепатиту В и отрицательным результатом ПЦР-анализа на исходном уровне должны получать соответствующую противовирусную профилактику или регулярное наблюдение в соответствии с местными или институциональными рекомендациями.

[00530] Профилактические антибиотики разрешены при наличии клинических показаний для минимизации риска развития инфекций мочевыводящих путей. Если у субъекта имеется симптоматическая УТИ, его лечат полным курсом антибиотиков, а исследуемое лекарственное средство будет приостановлено до разрешения инфекции.

[00531] Субъектам, у которых имеются симптомы учащенного, неотложного мочеиспускания или недержания, прописывают антихолинергические средства.

[00532] Все варианты лечения, которые исследователь считает необходимыми для здоровья субъекта, применяют по усмотрению исследователя в соответствии с общественными стандартами медицинской помощи.

(iii) Запрещенная сопутствующая терапия

[00533] Не следует принимать диуретики накануне дня введения дозы или в день введения дозы перед введением исследуемого лекарственного средства.

[00534] Насколько это возможно, следует избегать употребления жидкости за 4-6 часов до инстилляции внутрипузырного энфортумаба ведотина.

[00535] В ходе исследования субъекты не могут получать другие исследуемые лекарственные средства, лучевую терапию, внутрипузырную или системную противоопухолевую терапию.

6.2.6.5 *Контроль за нежелательными явлениями, возникшими в ходе лечения*

(i) Контроль за гипергликемией

[00536] Исследователи должны наблюдать за уровнем глюкозы в крови, и им рекомендуется провести дополнительные оценки, если наблюдаются какие-либо симптомы гипергликемии, в том числе тщательную оценку на наличие инфекции. Кроме того, при применении стероидов для лечения любого другого патологического состояния может быть необходим дополнительный контроль за уровнями глюкозы в крови. Если наблюдаются повышенные уровни глюкозы в

крови, субъектов следует лечить в соответствии с местными стандартами лечения и рассмотреть возможность направления в отделение эндокринологи.

[00537] Субъектам, особенно тем, у кого в анамнезе имеются записи о наличии или в настоящее время имеется сахарный диабет или гипергликемия, следует рекомендовать немедленно уведомить своего врача, если уровень глюкозы становится трудно контролировать или если они испытывают симптомы, указывающие на гипергликемию, такие как частое мочеиспускание, повышенная жажда, помутнение зрения, усталость и головная боль.

[00538] Субъекты, вошедшие в исследование с повышенным уровнем HbA1c ($\geq 6,5\%$) на исходном уровне, должны быть направлены к соответствующему медицинскому работнику во время фазы индукции для контроля за уровнем глюкозы. Уровень глюкозы в крови следует проверять перед каждым введением дозы и, если уровень глюкозы в крови >250 мг/дл, введение дозы следует приостановить. Введение дозы можно продолжать, как только уровень глюкозы в крови субъекта улучшится до ≤ 250 мг/дл и субъект станет стабилен с клинической и метаболической точки зрения. Применение инсулина разрешено как часть стандартного лечения. При уровне глюкозы в крови >500 мг/дл, который считается связанным с введением энфортумаба ведотина, необходимо прерывание введения лекарственного средства и необходима полная оценка гипергликемии для определения основного диагноза. При уменьшении гипергликемии/повышенного уровня глюкозы в крови до ≤ 250 мг/дл введение доз можно возобновить под тщательным наблюдением после консультации с медицинским наблюдателем. Если у субъекта наблюдается новое начало сахарного диабета, необходимо оценить его с помощью метаболической панели, в отношении кетонов в моче, HbA1c, C-пептида с целью оценки нового начала диабета 1-го типа на фоне предшествующей терапии ингибиторами контрольных точек.

(ii) Контроль за сыпью в результате введения энфортумаба ведотина

[00539] Энфортумаба ведотин представляет собой конъюгат лекарственного средства с антителом к нектину-4. Нектин-4 представляет собой молекулу клеточной адгезии, которая характеризуется высоким уровнем экспрессии при уротелиальной карциноме. Нектин-4 также характеризуется низкими - умеренными уровнями экспрессии в нормальных тканях, в том числе в кератиноцитах кожи, потовых железах и волосяных фолликулах, поэтому кожные реакции являются ожидаемыми явлениями. В связи с этим, кожные реакции представляют собой нежелательные явления, представляющее интерес во всех клинических исследованиях с энфортумаба ведотином.

[00540] Совокупный обзор послерегистрационных данных о безопасности с 18 декабря 2019 года (дата одобрения энфортумаба ведотина в США) по 22 октября 2020 года выявил сообщения о тяжелых кожных неблагоприятных реакциях у 15 пациентов, получавших внутривенно (IV) энфортумаба ведотин, для некоторых из которых все закончилось смертельным исходом. Данные реакции возникали преимущественно во время первого цикла лечения. АЕ, зарегистрированные в данных случаях, включали синдром Стивенса-Джонсона (SJS) (5 случаев), волдыри (3 случая), буллезный дерматит (3 случая), симметричную лекарственно-индуцированную интертригинозную и сгибательную экзантему (SDRIFE, 2 случая) и по 1 случаю каждого из эксфолиативного дерматита, эксфолиативной сыпи, эпидермального некроза, волдырей в ротоглотке, стоматита и токсического эпидермального некролиза (TEN).

[00541] В исследованиях системной монотерапии уротелиальной карциномы посредством энфортумаба ведотина серьезные нежелательные явления (SAE) в виде тяжелых кожных неблагоприятных реакций были зарегистрированы у 11 из 749 субъектов (1,5%) и включали буллезный дерматит (0,4%), лекарственную сыпь (0,4%), волдыри (0,1%), конъюнктивит (0,1%), SJS (0,1%), стоматит (0,1%) и токсическую кожную сыпь (0,1%).

[00542] Субъектам также следует рекомендовать немедленно связаться с исследователем, если у них появятся признаки и симптомы кожных реакций,

патологий слизистой оболочки полости рта и глаз, в том числе мукозит или конъюнктивит. Начиная с первого цикла и на протяжении всего лечения, необходимо проводить внимательное наблюдение за субъектами на предмет кожных реакций. В случае кожных реакций легкой - умеренной степени необходимо рассмотреть соответствующее лечение, такое как кортикостероиды для наружного применения и антигистаминные препараты по клиническим показаниям. В случае ухудшения сыпи или кожных реакций до 2-й степени тяжести необходимо рассмотреть возможность приостановки введения энфортумаба ведотина. В случае сыпи или кожных реакций 3-й или 4-й степени тяжести, а также при подозрении или подтвержденном SJS или TEN следует окончательно прекратить введение энфортумаба ведотина и рассмотреть возможность направления на специализированное лечение.

(a) Местный уход за кожей

[00543] Безопасность энфортумаба ведотина при воздействии через кожу или слизистые оболочки не была оценена в текущих клинических испытаниях или доклинических исследованиях. Следует соблюдать осторожность во избежание случайного воздействия на любую поверхность кожи, глаза или слизистой оболочки лекарственного средства во время инстилляций или мочи после инстилляций.

[00544] Поскольку во время инстилляций, времени пребывания в организме или опорожнения мочевого пузыря происходит непреднамеренное воздействие на кожу, лечащий исследователь должен перед каждой инстилляцией осмотреть локальную область гениталий и промежности на предмет любого раздражения или повреждения кожи. Для минимального раздражения или повреждения кожи следует применять местные защитные мази или повязки, чтобы предотвратить воздействие на кожу в данные периоды времени. В случае значительных изменений или повреждений кожи, отмеченных до инстилляций, в дополнение к консультации при медицинском наблюдении следует рассмотреть необходимые меры предосторожности и/или задержку введения дозы. Визуальный осмотр

области гениталий и промежности или других пораженных областей кожи следует проводить после опорожнения мочевого пузыря, если это возможно, или если субъект сообщает о случайном воздействии или симптомах, связанных с раздражением кожи.

[00545] Субъекты должны вымыть руки после опорожнения мочевого пузыря. При любом случайном воздействии на субъектов затронутую область кожи следует немедленно промыть мылом и водой. В последующие дни следует осматривать затронутую область на предмет развития какого-либо покраснения, зуда, отека или других симптомов. О любых симптомах необходимо немедленно сообщать лечащему исследователю для обеспечения надлежащего ухода и последующего наблюдения.

(iii) Аллергическая реакция/реакция гиперчувствительности

[00546] Аллергические реакции/реакции гиперчувствительности характеризуются нежелательными местными или общими ответами в результате воздействия аллергена (CTCAE NCI версии 5.0). Аллергические реакции/реакции гиперчувствительности могут проявляться в виде комбинации признаков или симптомов, в том числе зуда, различных типов сыпи, крапивницы, тошноты, рвоты, боли в спине или животе.

[00547] Разрешенные меры включают модификации дозы (таблица 16) и сопутствующие лекарственные препараты.

(iv) Контроль передозировки

[00548] В случае передозировки >10% энфортумаба ведотина исследовательский центр должен уведомить спонсора, как только ему станет известно о передозировке. За пациентом следует тщательно наблюдать на предмет неблагоприятных реакций. Поддерживающую терапию следует применять в соответствии с институциональными стандартами.

6.2.6.6 *Соблюдение режима лечения*

[00549] Введение исследуемого лекарственного средства будет осуществляться персоналом исследовательского центра и документироваться в первичных документах и в CRF.

6.2.7 ДЕЙСТВИЯ В ХОДЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.2.7.1 График мероприятий

[00550] АЕ и сопутствующие лекарственные препараты регистрируют, начиная с дня 1 (до введения дозы) и в течение всего периода регистрации сообщений по безопасности. Любое АЕ, связанное с протоколом исследования, а также любые сопутствующие лекарственные препараты, назначаемые для лечения АЕ, необходимо регистрировать с момента получения информированного согласия.

[00551] Клинические лабораторные оценки (развернутый биохимический анализ сыворотки крови, клинический анализ крови [CBC] с подсчетом форменных элементов [ручной подсчет форменных элементов при наличии клинических показаний] и анализ мочи [с рефлексивной микроскопией в случае отклонений от нормы]), физикальное обследование, вес и функциональный статус по ECOG проводят за 3 дня до введения исследуемого лекарственного средства, в день 1, неделю 1 фазы индукции. Перед введением дозы должны быть проверены результаты всех соответствующих клинических лабораторных оценок. График мероприятий представлен в таблице 17.

Таблица 17. График мероприятий

Оценки безопасности	Период между визитами	Скрининг/исходный уровень	Набор для участия	Фаза индукции ^А (с месяца 1 по месяц 3)										Фаза поддержания дозы ^В (сЕОТ месяца 4 месяца по месяц 12)	Последующее наблюдение ^С	Последующее наблюдение за продолжительностью жизни	
				Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4	Неделя 5	Неделя 6	Неделя 7	Неделя 8	Неделя 9	Неделя 10				Неделя 11
Визит для лечения		Дни с -28 по 1	Дни с -7 по 1	За 7 дней до 1-й дозы	День 1	День 2E	День 4E	День 1	День 2E	День 4E	День 1	День 2E	День 4E	С недели 12-14 ^В по неделе 52 (ежемесячно в течение 9 доз)	В пределах 30-37 дней от последней дозы ^С	Каждые 6 месяцев ^У	
Период между визитами					±1 день			±3 дня								±1 нед.	±2 недели
Оценки безопасности	Информированное согласие	X															
Оценки безопасности	Включение/исключение, анамнез болезни	X															
Оценки безопасности	Тест на беременность (сыворотка крови или моча, субъекты с репродуктивным потенциалом)	X															
Оценки безопасности	Физикальное обследование	X															
Оценки безопасности	Рост ^К	X															
Оценки безопасности	Вес	X															
Оценки безопасности	СВС с подсчетом форменных элементов ^Л	X															
Оценки безопасности	Развернутый биохимический анализ сы-	X															

Критериям до начала лечения соответствия

Отправить спонсору подтверждения

- l Необходимо проводить, если визит осуществляют в исследовательском центре.
- к Используют результаты измерения роста, полученные в течение предыдущих 12 месяцев.
- l Проводят в любой момент в ходе исследования при наличии клинических показаний.
- м Развернутый биохимический анализ сыворотки крови необходим на неделе 1, 3 и 6 только во время фазы индукции.
- н Если есть клинические показания.
- о Будут собраны показатели жизненно важных функций и будут зарегистрированы АЕ перед введением дозы и через 2 часа после первого опорожнения мочевого пузыря.
- р Если нет медицинских противопоказаний, необходима диагностическая качественная СТ грудной клетки с IV контрастированием. Если субъект не может переносить IV контрастирование, допускается проведение СТ грудной клетки без контрастирования. Для визуализации верхних отделов мочеточника, брюшной полости и таза допустимо получение СТ- или MRI-урограммы с контрастированием (если нет медицинских противопоказаний). Предыдущую визуализацию аналогичной методикой используют, если она выполнена в пределах 3 месяцев до начала исследуемого лечения.
- q Интервью будут проводить во время увеличения дозы и расширения периода введения доз в следующие моменты времени (+7-дневный интервал): в конце фазы индукции, при завершении 5 доз во время фазы поддержания дозы и в конце фазы поддержания дозы. Субъекты, прекратившие участие до недели 6 фазы индукции, пройдут выходящее интервьюирование во время своего последнего визита.
- r С момента получения информированного согласия.
- s В ходе фазы поддержания дозы зифортумаб вводят внутривенно раз в месяц в течение в общей сложности 9 доз.
- t Если возможно, необходим архивный образец опухоли или ткань, собранная в результате последней TURBT, произведенной в течение 12 месяцев после набора для участия в исследовании. Следует использовать наиболее свежую доступную ткань. Если можно получить только свежесрезанные препараты, необходимо минимум 10-15 срезов (если меньше 10, необходимо обратиться к спонсору).
- u Оценка ответа с помощью цистоскопии и цитологии мочи должна быть завершена в пределах 14 дней до следующего введения исследуемого лекарственного средства. Субъекты с патологическими результатами цистоскопии, положительными или патологическими результатами цитологии мочи должны быть подвергнуты дополнительной оценке (например, визуализации, биопсии, исследованию под анестезией) по клиническому усмотрению исследователя.
- v Субъекты должны пройти цистоскопию перед входом в фазу поддержания дозы.
- w Все видимые папиллярные опухоли Ta/T1 должны быть полностью удалены в пределах 60 дней до набора для участия в исследовании. Допускается наличие остаточной истинной CIS. Субъекты с заболеванием T1 должны пройти повторную TURBT до начала исследования. Повторная стадия TURBT должна показать отсутствие поражения собственной мышечной оболочки. Оценка ответа опухоли с помощью цистоскопии после стандартного средства лечения (т. е. цистоскопии ± биопсии) и цитологическое исследование будут проведены каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования

заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше. Для всех субъектов дополнителная оценка (например, визуализация, биопсия) должна рассматриваться как клинически показанная на основании результатов, полученных во время оценки опухоли, таких как отклонения от нормы при цистоскопии, положительные результаты цитологического исследования мочи и наличие 2 или более последовательных цитологических образцов мочи с подозрительными или неопределенными результатами.

x При оценке на месяце 12 хода исследования мочевого пузыря (необходимо минимум 4 биоптата). Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но будет рассмотрена при наличии клинических показаний для оценки эффективности.

y После досрочного завершения исследуемого лечения по причине персистенции, рецидива, прогрессирования заболевания или начала последующей противораковой терапии субъекты войдут в период последующего наблюдения за продолжительностью жизни. Данные о продолжительности жизни и последующей противораковой терапии будут собираться каждые 6 месяцев (± 2 недели) до прекращения последующего наблюдения, отзыва согласия, смертельного исхода или прекращения исследования спонсором, в зависимости от того, что наступит раньше, в течение максимум 5 лет после набора для участия в исследовании.

z Перед введением дозы убедитесь путем взятия крови из вены, либо взятия крови из пальца, что уровень глюкозы в крови составляет <250 мг/дл.

aa Развернутый биохимический анализ сыворотки крови должен включать следующие тесты: альбумин, щелочную фосфатазу, ALT, AST, бикарбонат, азот мочевины крови, кальций, креатинин, хлорид, лактатдегидрогеназу, фосфор, калий, натрий, общий билирубин, амилазу, липазу, глюкозу и мочевую кислоту.

bb Полное обследование глаз, проводимое квалифицированным оптометристом или офтальмологом, в том числе без ограничения проверки остроты зрения, обследование глаза с помощью щелевой лампы, тонометрическое обследование и обследование расширенного глазного дна. Последующие обследования глаз следует проводить по клиническим показаниям. Обследования с помощью щелевой лампы в ЕОТ необходимы для субъектов, которые во время исследования испытывают АЕ на роговице, и должны быть проведены по меньшей мере через 4 недели после последней дозы.

cc Только на месяце 4. Субъекты с рецидивирующим заболеванием Та с высокой степенью тяжести на момент первой оценки через 3 месяца участия в исследовании могут продолжить терапию после получения повторного согласия на продолжение исследуемого лечения и должны еще раз пройти оценку через 6 месяцев.

dd Все известные локализации заболевания должны быть документированы на этапе скрининга и повторно оценены при каждой последующей оценке опухоли.

Таблица 18. СБОРЫ ДАННЫХ ПО РК, АТА И БИОМАРКЕРАМ (КРОВИ)

Фаза исследования	День исследования	Время	Интервал	Относительное время	РК (крови)	АТА	Нектин-4	РВМС	Цитокин	сfDNA	Образец
Скрининг	с -28 по 1	N/A	N/A	N/A							
Недели 1, 2 и 6 фазы индукции	День 1	До введения дозы	24 ч	НАЧАЛО инстилляции	X	X	X	X	X	X	X
		После опорожнения	+15 мин	КОНЕЦ пребывания в организме	X						
	День 2 ^D		±15 мин	низме	X						
		День 4 ^D	24 ч	±4 ч	КОНЕЦ пребывания в организме	X					
Недели 3, 4 и 5 фазы индукции	День 1	До введения дозы	24 ч	НАЧАЛО инстилляции	X	X	X	X	X	X	X
		После опорожнения	+15 мин	КОНЕЦ пребывания в организме	X						
	Поддержание дозы (с месяца 4 по месяц 12)	До введения дозы	24 ч	±15 мин	НАЧАЛО инстилляции	X	X	X	X	X	X
		После опорожнения	+15 мин	низме	X						
ЕОТ	Последующее наблюдение ^E	До введения дозы	24 ч	НАЧАЛО инстилляции	X	X	X	X	X	X	X
		После опорожнения	+15 мин	КОНЕЦ пребывания в организме	X						

ATA = антитело к исследуемому терапевтическому средству; cfDNA = свободная ДНК в кровотоке; ЕОТ = окончание лечения; N/A = неприменимо; РВМС = моноклеарные клетки периферической крови; РК = фармакокинетика; TURBT = трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря

^A Если образец опухоли получен в рамках стандартного лечения в ходе исследования, часть данного образца, если таковой имеется, должна быть отправлена спонсору для тестирования биомаркеров. Ткань биоптатов, собранную во время лечения, применяют для оценки биомаркеров.

в Если TURBT проводят в рамках скринингового интервала, сбор биомаркеров для их оценки на этапе скрининга необходимо производить до или во время TURBT.

с Если возможно, необходим архивный образец опухоли или ткань, собранная в результате последней TURBT, произведенной в течение 12 месяцев после набора для участия в исследовании. Следует использовать наиболее свежую доступную ткань. Если можно получить только свежесрезанные препараты, необходимо минимум 10-15 срезов (если меньше 10, необходимо обратиться к спонсору).

- д Образцы для РК можно взять в день 2 и 4 во время визитов на дом стороннего медицинского работника для оказания услуг на дому.
- е При оценке на месяце 12 хода исследования необходима биопсия с картированием мочевого пузыря. При отсутствии видимой опухоли следует провести забор биоптатов из всех квадрантов мочевого пузыря (необходимо минимум 4 биоптата). Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но будет расемогрена при наличии клинических показаний для оценки эффективности.
- г Последующее наблюдение будут проводить каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше.

Таблица 19. СБОРЫ ДАННЫХ ПО РК И БИОМАРКЕРАМ (МОЧА)

Фаза исследования	День исследования	Время	Интервал	Относительное время	РК (моча)	PK (мо-сfDNA мочи)	Цитокин к нектину-4 в моче
Скрининг	с -28 по 1	N/A	N/A	N/A		XA	XA
	День 1	До введения дозы	24 ч	НАЧАЛО инстиляции	X	X	X
Недели 1, 2 и 6 индукции	День 1	Опорожнение ^b	Нет ^b	КОНЕЦ времени пребывания в ор-ганизме ^c	X		
		2 ч	±15 мин ^d		X		
	День 2 ^e	24 ч	±4 ч	КОНЕЦ времени пребывания в ор-ганизме	X		
	День 4 ^e	72 ч	±4 ч	НАЧАЛО инстиляции	X	X	X
Недели 3, 4 и 5 индукции; и месяцы 4-12 фазы поддержания дозы	День 1	До введения дозы	24 ч	НАЧАЛО инстиляции	X		
		Опорожнение ^b	Нет ^b	КОНЕЦ времени пребывания в ор-ганизме ^c	X		
ЕОТ					X	X	X
					X	X	X
Последующее наблюдение ^f							

sfDNA = свободная ДНК в кровотоке; ЕОТ = окончание лечения; N/A = неприменимо; РК = фармакокинетика; TURBT = трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря

- а Если TURBT проводят в рамках скринингового интервала, сбор биомаркеров для их оценки на этапе скрининга необходимо производить до или во время TURBT.
- в Сразу после завершения времени пребывания в организме следует собрать выделенную в ходе опорожнения мочевого пузыря мочу. Сбор мочи будет представлять собой опорожнение мочи из мочевого пузыря после максимального 90-минутного времени пребывания в организме (или окончания переносимого субъектом времени пребывания в организме) для исследования лекарственного средства.
- с После инстиляции исследуемого лекарственного средства субъекты будут удерживать исследуемое лекарственное средство в течение максимум 90 минут времени пребывания в организме или до конца времени пребывания в организме, которое может перенести субъект.
- д Второй сбор мочи после завершения опорожнения мочевого пузыря после максимального 90-минутного времени пребывания в организме (или опорожнения мочевого пузыря после завершения пребывания в организме, которое может перенести субъект).
- е Образцы для РК можно взять в день 2 и 4 во время визитов на дом стороннего медицинского работника для оказания услуг на дому.
- ф Последующее наблюдение будут проводить каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше.

6.2.7.2 Скрининговый визит (с дня ~28 по день 1)

- Информированное согласие
- Соответствие критериям включения/исключения для участия в исследовании
- Анамнез болезни
- Электрокардиограмма (ECG)
- Визуализация (предыдущую визуализацию аналогичной методикой используют, если она выполнена в пределах 3 месяцев до начала исследуемого лечения):
 - Если нет медицинских противопоказаний, необходима диагностическая качественная СТ грудной клетки с IV контрастированием. Если субъект не может переносить IV контрастирование, допускается проведение СТ грудной клетки без контрастирования.
 - Для визуализации верхних отделов мочеточника, брюшной полости и таза допустимо получение СТ- или MRI-урограммы с контрастированием (если нет медицинских противопоказаний).
- Полное обследование глаз
- Начать сбор архивных образцов биоптатов опухоли для отправки при наборе для участия в исследовании
- Цитоскопия и цитология (все известные локализации заболевания должны быть документированы на этапе скрининга и повторно оценены при каждой последующей оценке опухоли. Субъекты с заболеванием T1 должны пройти повторную TURBT до начала исследования. Повторная стадия TURBT должна показать отсутствие поражения собственной мышечной оболочки)
- Биопсия (если есть клинические показания)

- Сбор образцов крови и мочи для оценки биомаркеров (если возможно и если применимо, сбор необходимо осуществлять до или во время TURBT)

6.2.7.3 *Визит на исходном уровне (с дня ~7 по день 1)*

- Физикальное обследование
- Рост и вес (используют результаты измерения роста, полученные в течение предыдущих 12 месяцев)
- Показатели жизненно важных функций
- Функциональный статус по ECOG
- Сбор образцов крови и мочи для следующего:
 - CBC с подсчетом форменных элементов,
 - развернутого биохимического анализа сыворотки крови (в том числе глюкозы),
 - HbA1c,
 - серологии (гепатит В и С),
 - протромбинового времени/частичного тромбопластинового времени/международного нормализационного индекса (PT/PTT/INR),
 - анализа мочи (с рефлексивной микроскопией при результатах, не соответствующих норме),
 - теста на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче для субъектов с репродуктивным потенциалом.

6.2.7.4 *Фаза индукции (с месяца 1 по месяц 3)*

- (i) С дня 1 недели 1 по неделю 6 (± 1 день только после недели 1)

- Перед внутривенным введением энфортумаба ведотина:
 - подтвердить соответствие субъекта критериям включения/исключения; зарегистрировать анамнез болезни (только неделя 1),
 - физикальное обследование; рассмотреть новые или текущие симптомы,*
 - вес,*
 - функциональный статус по ECOG (только на неделе 1),*
 - показатели жизненно важных функций,
 - собрать данные об АЕ и сопутствующих лекарственных препаратах (если применимо),
 - сбор образцов крови и/или мочи для следующего:
 - развернутого биохимического анализа сыворотки крови (только недели 1, 3 и 6),*
 - проверки путем либо взятия крови из вены, либо взятия крови из пальца перед введением дозы, что уровень глюкозы составляет <250 мг/дл,
 - CBC с подсчетом форменных элементов,
 - PT/PTT/INR (при наличии клинических показаний),
 - оценки РК/антител к исследуемому терапевтическому средству (АТА),
 - оценки биомаркеров,
 - теста на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче (недели 1, 3 и 6) (только субъекты с репродуктивным потенциалом) (не требуется, если был взят в течение 7 дней до введения дозы),
 - анализа мочи (с рефлексивной микроскопией при результатах, не соответствующих норме)*;

- результаты клинических лабораторных оценок должны быть проверены и должны подтверждать соответствие критериям до введения исследуемого лекарственного средства (только на неделе 1);
- внутривезикулярное введение энфортумаба ведотина (необходимо вводить q1wk в течение 6 недель);
- после завершения внутривезикулярного введения энфортумаба ведотина:
 - показатели жизненно важных функций (должны быть сняты через 2 часа [± 15 минут] после первого опорожнения мочевого пузыря),
 - наблюдение в течение 2 часов после первого опорожнения мочевого пузыря,
 - собрать данные об АЕ и сопутствующих лекарственных препаратах (если применимо),
 - образцы крови и мочи для РК-оценок.

* Только в день 1 недели 1, указанные оценки собирают в течение 3 дней до введения дозы.

(ii) День 2 с недели 1 по неделю 6

[00552] Визиты в день 2 на фазе индукции проводят в клинике или посредством визита в форме телемедицины/телефонного звонка. У субъектов, которые не являются для визитов в клинике, образцы крови и мочи собирают посредством медицинского работника для оказания услуг на дому.

- Физикальное обследование (необходимо проводить, если визит осуществляют в исследовательском центре)
- Интервью с субъектом (+7-дневный интервал; только неделя 6; субъекты, прекратившие участие до недели 6 фазы индукции, пройдут выходное интервьюирование во время своего последнего визита)

- Собрать данные об АЕ и сопутствующих лекарственных препаратах (если применимо)

- Образцы крови и мочи для оценок РК (± 4 часа; только недели 1, 2 и 6)

(iii) День 4 с недели 1 по неделю 6

[00553] У субъектов, которые не являются для визитов в клинике, образцы крови и мочи собирают посредством медицинского работника для оказания услуг на дому.

- Собрать данные об АЕ и сопутствующих лекарственных препаратах (если применимо)

- Образцы крови и мочи для оценок РК (± 4 часа; только недели 1, 2 и 6)

(iv) День 1 недели 9 (± 3 дня)

[00554] Тест на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче (только субъектов с репродуктивным потенциалом).

6.2.7.5 Фаза поддержания дозы (с месяца 4 по месяц 12)

(i) День 1 (± 3 дня)

- Перед внутрипузырным введением энфортумаба ведотина:

- информированное согласие (только на месяце 4; субъекты с персистирующей CIS или рецидивирующим заболеванием Та с высокой степенью тяжести на момент первой оценки через 3 месяца участия в исследовании могут продолжить терапию после получения повторного согласия на продолжение исследуемого лечения и должны еще раз пройти оценку через 6 месяцев),

- физикальное обследование; рассмотреть новые или текущие симптомы,*

- вес,

- функциональный статус по ECOG,
- показатели жизненно важных функций,
- собрать данные об АЕ и сопутствующих лекарственных препаратах (если применимо),
- сбор образцов крови и/или мочи для следующего:
- развернутого биохимического анализа сыворотки крови,
- проверки путем либо взятия крови из вены, либо взятия крови из пальца перед введением дозы, что уровень глюкозы составляет <250 мг/дл,
- CBC с подсчетом форменных элементов,
- РТ/РТТ/INR (при наличии клинических показаний),
- оценок РК/АТА,
- оценок биомаркеров,
- теста на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче (только субъекты с репродуктивным потенциалом) (не требуется, если был взят в течение 7 дней до введения дозы),
- анализа мочи (с рефлексивной микроскопией при результатах, не соответствующих норме);
- цистоскопия и цитология (субъекты должны проходить цистоскопию до вхождения в фазу поддержания дозы и каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании; необходимо пройти в течение 14 дней до введения исследуемого лекарственного средства);
- биопсия с картированием мочевого пузыря (необходима при оценке на месяце 12. При отсутствии видимой опухоли следует провести забор биоптатов

из всех квадрантов мочевого пузыря [необходимо минимум 4 биоптата]. Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но будет рассмотрена при наличии клинических показаний для оценки эффективности);

- внутривезикулярное введение энфортумаба ведотина (необходимо вводить ежемесячно в течение в общей сложности 9 доз);
- после завершения внутривезикулярного введения энфортумаба ведотина:
 - показатели жизненно важных функций (должны быть сняты через 2 часа $[\pm 15]$ минут] после первого опорожнения мочевого пузыря),
 - наблюдение в течение 2 часов после первого опорожнения мочевого пузыря,
 - собрать данные об АЕ и сопутствующих лекарственных препаратах (если применимо),
 - образцы крови и мочи для РК-оценок.

(ii) День 15 (± 3 дня)

[00555] Визит в день 15 необходим во время первых 3 поддерживающих доз и будет проведен посредством телемедицины/телефонного звонка для оценки АЕ и сопутствующих лекарственных препаратов.

- Интервью с субъектом (необходимо провести после получения 5 доз во время фазы поддержания дозы и в конце фазы поддержания дозы [+7-дневный интервал])

6.2.7.6 *Оценки ответов*

[00556] Оценку ответа от опухоли в исследовании проводят с помощью стандартной цистоскопии (т. е. цистоскопии \pm биопсии) и цитологического исследования на этапе скрининга с последующими оценками каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для

участия в исследовании и каждые 6 месяцев после этого в течение 5 лет после набора для участия в исследовании.

[00557] Оценка ответа с помощью цистоскопии и цитологии мочи должна быть завершена в пределах 14 дней до следующего введения исследуемого лекарственного средства. Субъекты с патологическими результатами цистоскопии, положительными или патологическими результатами цитологии мочи должны быть подвергнуты дополнительной оценке (например, визуализации, биопсии, исследованию под анестезией) по клиническому усмотрению исследователя.

[00558] При оценке на месяце 12 хода исследования необходима биопсия с картированием мочевого пузыря. При отсутствии видимой опухоли следует провести забор биоптатов из всех квадрантов мочевого пузыря (необходимо минимум 4 биоптата). Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но рассматривается при наличии клинических показаний для оценки эффективности.

6.2.7.7 Визит по окончании лечения (через 30-37 дней после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства)

[00559] Визиты по окончании лечения (ЕОТ) должны проводиться через 30-37 дней после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства, если только они не задерживаются из-за АЕ. Примечание: время до визита ЕОТ превышает 37 дней для субъектов, которые прекращают лечение после цистоскопии на месяце 3; однако оценки ЕОТ необходимо произвести до начала нового противоракового лечения. Если оценки ЕОТ завершены до истечения 30 дней после последнего исследуемого лечения, с субъектом связываются через 30-37 дней после последнего лечения для оценки АЕ.

- Физикальное обследование
- Показатели жизненно важных функций

- Функциональный статус по ECOG
- Полное обследование глаз, если применимо (обследования с помощью щелевой лампы в ЕОТ необходимы для субъектов, которые во время исследования испытывают АЕ на роговице, и должны быть проведены по меньшей мере через 4 недели после последней дозы)
- Собрать данные об АЕ и сопутствующих лекарственных препаратах (если применимо)
- Сбор образцов крови и/или мочи для следующего:
 - развернутого биохимического анализа сыворотки крови (в том числе глюкозы),
 - CBC с подсчетом форменных элементов,
 - оценок РК/АТА,
 - оценок биомаркеров,
 - теста на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче (только субъектов с репродуктивным потенциалом),
 - анализа мочи (с рефлексивной микроскопией при результатах, не соответствующих норме);
- Статус заболевания, статус продолжительности жизни, сбор данных после первой последующей терапии (если применимо)

6.2.7.8 *Последующее наблюдение (± 1 неделя)*

[00560] Субъекты, которые прекращают исследуемое лечение по причинам, отличным от персистенции, рецидива или прогрессирования заболевания, и субъекты, завершившие фазу поддержания дозы, входят в фазу последующего наблюдения в ходе исследования. В ходе фазы последующего наблюдения оценку ответа опухоли с помощью цистоскопии после стандартного средства

лечения (т. е. цистоскопии ± биопсии) и цитологического исследования проводят каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше.

[00561] Проводят представленные далее оценки каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше.

- Физикальное обследование
- Тест на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче (только субъекты с репродуктивным потенциалом) (собирают ежемесячно в течение 6 месяцев после введения последней дозы энфортумаба ведотина)
- Анализ мочи (с рефлексивной микроскопией при результатах, не соответствующих норме)
- Визуализация (если есть клинические показания)
- Образцы крови и мочи для оценки биомаркеров
- Цитоскопия и цитология
- Биопсия (если есть клинические показания)
- Сбор данных об АЕ, если они серьезные и считаются связанными с исследуемым лечением

6.2.7.9 *Последующее наблюдение за продолжительностью жизни (± 2 недели)*

[00562] После досрочного завершения исследуемого лечения по причине персистенции, рецидива, прогрессирования заболевания или начала последующей противораковой терапии субъекты входят в период последующего наблюдения за продолжительностью жизни. Данные о статусе заболевания, продолжительности жизни и последующей противораковой терапии собирают каждые 6 месяцев (± 2 недели) до прекращения последующего наблюдения, отзыва согласия, смертельного исхода или прекращения исследования спонсором, в зависимости от того, что наступит раньше, в течение максимум 5 лет после набора для участия в исследовании.

6.2.7.10 *Окончание исследования/окончание последующего наблюдения*

[00563] Будут регистрировать дату, когда субъект соответствовал критериям досрочного завершения исследования, и причину досрочного завершения исследования.

6.2.8 **ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ОЦЕНКИ**

6.2.8.1 *Оценки на этапе скрининга/исходном уровне*

[00564] В данное исследование набирают только субъектов, соответствующих критериям отбора.

[00565] Анамнез болезни субъекта включает тщательный обзор значительного прошлого анамнеза болезни, текущих патологических состояний, любого лечения предшествующих злокачественных новообразований и ответа на предыдущее лечение, а также любых сопутствующих лекарственных препаратов.

[00566] Физикальные обследования должны включать оценки следующих частей/систем тела: брюшной полости, конечностей, головы, сердца, легких, шеи и неврологического статуса. Также измеряют вес и рост; используют результаты измерения роста, полученные в течение предыдущих 12 месяцев.

[00567] На этапе скрининга проводят полное обследование глаз.

[00568] Тесты крови и мочи включают CBC с подсчетом форменных элементов, развернутый биохимический анализ сыворотки крови, HbA1c, глюкозу, серологию (гепатит В и С), PT/PTT/INR и анализ мочи (с рефлексивной микроскопией при результатах, не соответствующих норме). Тест на беременность сыворотки крови или мочи проводят у субъектов с репродуктивным потенциалом.

[00569] Собирают образцы крови и мочи для оценки биомаркеров. Если возможно, необходим архивный образец опухоли или ткань, собранные в результате последней TURBT, произведенной в течение 12 месяцев после набора для участия в исследовании. Дополнительную информацию см. в таблице 18 и таблице 19.

[00570] Всем субъектам на этапе скрининга проводят ECG.

[00571] СТ грудной клетки и верхних отделов мочеточника, брюшной полости и таза с помощью СТ- или MRI-урографии необходимо сделать в пределах 3 месяцев до начала исследуемого лечения. Для СТ грудной клетки предпочтительной является визуализация с контрастированием. Если субъект не может переносить IV контрастирование, допускается проведение СТ без контрастирования. Для визуализации верхних отделов мочеточника, брюшной полости и таза допустимо получение СТ- или MRI-урограммы с контрастированием (если нет медицинских противопоказаний).

6.2.8.2 *Оценка ответа/противоопухолевой активности*

[00572] Оценку ответа от опухоли в исследовании проводят с помощью стандартной цистоскопии (т. е. цистоскопии ± биопсии) и цитологического исследования на момент скрининга с последующими оценками каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев после этого в течение 5 лет после набора для участия в исследовании.

[00573] Оценка ответа с помощью цистоскопии и цитологии мочи должна быть завершена в пределах 14 дней до следующего введения исследуемого лекарственного средства. Субъекты с патологическими результатами цистоскопии, положительными или патологическими результатами цитологии мочи должны быть подвергнуты дополнительной оценке (например, визуализации, биопсии, исследованию под анестезией) по клиническому усмотрению исследователя.

[00574] Пока субъект принимает участие в исследовании, проводят ежегодную визуализацию верхних отделов мочеточника по клиническим показаниям.

[00575] Для оценки исследования приемлемыми являются цистоскопия в белом свете, цистоскопия с узкоспектральной эндоскопией или флуоресцентная (в синем свете). Насколько это возможно, после начала исследуемого лечения на протяжении всего исследования для наблюдения за заболеванием у каждого субъекта следует применять один и тот же способ цистоскопии и отражать его в CRF исследования.

[00576] При оценке на месяце 12 хода исследования необходима биопсия с картированием мочевого пузыря. При отсутствии видимой опухоли следует провести забор биоптатов из всех квадрантов мочевого пузыря (необходимо минимум 4 биоптата). Биопсия не нужна в ходе всех остальных визитов, но рассматривается при наличии клинических показаний для оценки эффективности.

[00577] Субъектов считают имеющими CR, если у них присутствуют все представленные далее результаты.

1. Цистоскопия: нормальный внешний вид мочевого пузыря. В случае патологического внешнего вида мочевого пузыря при цистоскопии результаты биопсии должны быть отрицательными или свидетельствовать о низком уровне Та, папиллярном уротелиальном новообразовании любой степени тяжести с низким потенциалом или папилломе любой степени. Если производят случайные

биопсии мочевого пузыря, данные биопсии должны давать отрицательный результат или свидетельствовать о заболевании с низкой степенью тяжести.

2. Цитологическое исследование мочи: отрицательный результат.

a. Результаты цитологического исследования мочи, которые не являются убедительными, необходимо подвергнуть оценке.

b. Положительный результат цитологического исследования мочи необходимо дополнительно оценить в клинических условиях с помощью цистоскопии ± биопсии и визуализации.

3. Визуализация (при ее проведении): норма или, если обнаружена патология, результаты должны подтверждать CR в мочевом пузыре.

[00578] В связи с внутривезикулярным введением исследуемого средства лечения считается, что у субъекта есть CR, если у него отрицательный результат цистоскопии с результатом цитологического исследования мочи, указывающим на наличие злокачественного новообразования, если рак обнаружен в верхних отделах мочеточника или простатической части уретры, а результаты случайной биопсии мочевого пузыря являются отрицательными.

(i) Интерпретация результатов цитологического исследования мочи

- Если у субъекта во время исследования имеет место положительный результат цитологического исследования мочи, исследователь, по клиническим показаниям, должен провести дополнительную оценку с помощью цистоскопии и/или визуализации верхних отделов мочеточника.

- Положительный результат цитологического исследования мочи нельзя использовать сам по себе в качестве индикатора прогрессирования заболевания, и поэтому необходимо проводить подтверждающие клинические исследования.

- Если результаты цитологического исследования мочи являются неудовлетворительными, с атипичным содержанием клеток, подозрительными

или неопределенными, то в пределах следующего 21 дня необходимо провести повторное цитологическое исследование. Время между заборами образцов должно составлять как минимум >24 часов.

- Если 2 последовательных повторных результата цитологического исследования мочи являются подозрительными или неопределенными, данные результаты необходимо подвергнуть дополнительной клинической оценке с помощью цистоскопии и/или визуализации верхних отделов мочеточника по решению лечащего исследователя.

- Если у субъекта результат цитологического исследования мочи подозрительный или неопределенный, а биопсия отрицательная, то результат интерпретируют как отрицательный.

- Если 2 последовательных результата окажутся неудовлетворительными или атипичными, общий результат будут считать отрицательным.

[00579] Персистирующее заболевание определяют как наличие заболевания CIS с папиллярным заболеванием или без него (Ta/T1 с высокой степенью тяжести).

[00580] Рецидив определяют как повторное появление заболевания с высокой степенью тяжести (Ta, T1 или CIS с высокой степенью тяжести) после начала терапии. Рецидив должен быть подтвержден результатами биопсии.

[00581] Прогрессирование определяют как развитие любого из следующих: заболевания T1 (инвазии в собственный слой), заболевания \geq T2 (инвазии в мышцы), лимфатического узла (N1+), отдаленных метастаз (M1) или повышения степени тяжести от низкой до высокой.

[00582] Персистенция, появление или наличие заболевания более низкой степени тяжести не считается рецидивом. Субъекты с рецидивирующим папиллярным заболеванием с низкой степенью тяжести могут быть подвергнуты резекции и продолжить исследование.

[00583] Клинические данные субъектов должны быть доступны для проверки источника в CRF.

6.2.8.3 *Оценки фармакокинетики и иммуногенности*

[00584] Образцы крови и мочи для анализов РК и АТА собирают на протяжении всего периода исследования в соответствии с графиком сбора образцов, представленным в таблице 18 и таблице 19. Концентрации энфортумаба ведотина, ас-ММАЕ, общего антитела (TAb) и неконъюгированного ММАЕ будут определять с использованием валидированных анализов. Анализы могут включать твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), а также другие анализы, если потребуется дополнительное изучение характеристик. Образцы для изучения РК сохраняют в архиве для возможного анализа других соединений, родственных энфортумаба ведотину. Для определения уровней АТА к энфортумаба ведотину в сыворотке крови применяют электрохемилюминесцентный анализ. Подлежащие оценке дозозависимые РК-параметры крови для энфортумаба ведотина могут включать без ограничения площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC), максимальную концентрацию (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), кажущийся конечный период полужизни (t_{1/2}) и остаточную концентрацию (C_{trough}).

[00585] При необходимости оценивают дополнительные анализы.

6.2.8.4 *Оценки фармакодинамики и биомаркеров*

[00586] Оценки биомаркеров проводят в моче, периферической крови и опухолевой ткани, как указано в данном разделе и в Графике мероприятий. Оценки биомаркеров не используют для отбора субъектов. Исследовательские, предиктивные и прогностические биомаркеры, связанные с наблюдениями за ответом, резистентностью или безопасностью, отслеживают до и во время лечения энфортумаба ведотином.

[00587] Первичные эффекты энфортумаба ведотина на опухолевые клетки могут приводить к изменениям состояния активации локальных, опухолеассоциированных и периферических иммунных клеток. Оценки биомаркеров в образцах крови и мочи могут включать без ограничения анализ в кровотоке/бесклеточной опухолевой ДНК, оценку методом ELISA растворимого нектин-4, иммуноанализы биомаркеров в моче и маркеров иммунной функции, в том числе относительное содержание субпопуляций иммунных клеток и цитокинов.

[00588] Архивная опухолевая ткань, собранная в пределах 12 месяцев после набора для участия в исследовании, должна быть от всех субъектов, если таковая была (необходимо использовать наиболее последнюю доступную ткань). Если можно получить только свежесрезанные препараты, необходимо минимум 10-15 срезов (если меньше 10, необходимо обратиться к спонсору). Биопсия необходима при обследовании на месяце 12 и должна проводиться по клиническим показаниям в ходе всех остальных оценок. Если образец опухоли получен в рамках стандартного лечения в ходе исследования, часть данного образца должна быть отправлена спонсору для тестирования биомаркеров.

[00589] Забор биоптатов должен производиться соответствующим образом обученный персонал клинического центра. Рекомендуется, чтобы во время забора биоптатов присутствовал патологоанатом, когда это возможно, чтобы убедиться в достаточности опухолевого содержимого в месте забора биоптата и подтвердить, что методики получения и обработки биоптатов являются оптимальными (Ferry-Gallow 2018).

[00590] Для понимания взаимосвязи между биологическими характеристиками опухолей до лечения и результатами лечения субъекта, исследуют ткани TURBT (биоптаты опухоли). Биоптаты оценивают в отношении наличия специфических фармакодинамических, предиктивных и прогностических биомаркеров в опухоли. Если ткань доступна из полученного стандартным методом биоптата, собранного после набора для участия в исследовании, ее также можно

исследовать в отношении дополнительного выявления биомаркеров ответа, а также механизма действия и устойчивости к лечению.

[00591] Оценки биомаркеров в опухолевой ткани могут включать без ограничения центральную оценку экспрессии нектин-4 и PD-L1 с помощью иммуногистохимического анализа и секвенирования следующего поколения, подтипирование опухоли, анализ опухолевого микроокружения и профилирование соматических мутаций или изменений в генах или РНК, которые обычно изменяются при раке.

6.2.8.5 *Репозитарий биообразцов*

[00592] Только в США для субъектов, давших дополнительное согласие, оставшаяся деидентифицированная неиспользованная кровь и/или ткань сохраняется спонсором исследования и используется для будущих исследований, в том числе без ограничения оценки мишеней для новых терапевтических средств, биологических исследований механизмов чувствительности и устойчивости ADC, а также идентификации биомаркеров ADC. Образцы крови и тканей, пожертвованные для будущих исследований, хранят в течение периода до 25 лет. Если дополнительное согласие не предоставлено, все оставшиеся биологические образцы уничтожают после завершения исследования и выполнения всех применимых нормативных обязательств.

6.2.8.6 *Интервьюирование субъекта*

[00593] Точку зрения субъекта качественно оценивают с помощью телефонных интервью, длящихся от 45 до 60 минут, охватывающих темы, связанные с опытом и переносимостью лечения. Дополнительная информация, касающаяся тем и вопросов, которые рассматриваются во время данных интервью, описана в «Руководстве по интервьюированию субъекта». Интервью проводят во время увеличения доз и расширения периода введения доз в следующие моменты

времени: в конце фазы индукции, при завершении 5 доз во время фазы поддержания дозы и в конце фазы поддержания дозы.

6.2.8.7 *Оценки безопасности*

[00594] Оценка безопасности в ходе данного исследования состоит из наблюдения и регистрации АЕ, в том числе SAE, регистрации сопутствующих лекарственных препаратов и измерения результатов предусмотренных протоколом физикального обследования и лабораторных тестов.

(i) Нежелательные явления

(a) Определения

Нежелательное явление

[00595] В соответствии с руководством E2A «Терминология и стандарты экспресс-отчетности» Международного совета по гармонизации (ICH) и 21 CFR 312.32 «Отчетность о безопасности IND», АЕ представляет собой любое неблагоприятное медицинское проявление у субъекта или субъекта клинического исследования, которому был введен медицинский продукт, и которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с данным лечением.

[00596] При принятии решения о необходимости регистрации или не регистрации результатов теста, медицинского состояния или другого происшествия в CRF в разделе о нежелательных явлениях следует учитывать следующую информацию:

- С момента получения информированного согласия до дня, предшествующего дню 1 исследования, следует регистрировать только АЕ, связанные с протоколом исследования. Связанные с протоколом АЕ определяют как нежелательное медицинское явление, возникающее в результате предусмотренной протоколом процедуры.
- Необходимо регистрировать все медицинские состояния,

присутствующие или продолжающиеся до введения дозы в день 1 исследования, которые приводят к повышению степени NC I CTCAE.

- Необходимо регистрировать медицинские состояния, присутствующие или продолжающиеся до введения дозы, производимого в день 1 исследования, которые ухудшаются по степени тяжести, увеличиваются по частоте, становятся связанными с исследуемым лекарственным средством или ухудшаются каким-либо другим образом, но не соответствуют порогу для повышения степени CTCAE NCI.
- Все АЕ (независимо от связи с исследуемым лекарственным средством) следует регистрировать, начиная с дня 1 исследования (во время и после введения дозы) и до конца периода регистрации сообщений по безопасности. Осложнения, которые возникают в связи с любой процедурой (например, биопсией), следует регистрировать как АЕ, независимо от того, была ли данная процедура предусмотрена протоколом.
- Как правило, отклонения от нормы лабораторных показателей не следует регистрировать как АЕ, за исключением случаев, когда они связаны с клиническими признаками или симптомами, нуждаются во вмешательстве, приводят к SAE или приводят к прекращению исследования или прерыванию/досрочному завершению исследуемого лечения. При регистрации АЕ, возникшего в результате отклонений лабораторных показателей от нормы, следует регистрировать возникшее в результате медицинское состояние, а не само отклонение от нормы (например, регистрировать «анемию», а не «низкий гемоглобин»).

Серьезные нежелательные явления

[00597] АЕ следует классифицировать как SAE, если оно соответствует одному из следующих критериев:

Смертельное: АЕ приводит к смертельному исходу

Угрожающие жизни: АЕ несут для субъекта непосредственный риск смертельного исхода. Данная классификация не применима к АЕ, которые гипотетически могли бы привести к смертельному исходу, если бы были более тяжелыми.

Госпитализация: АЕ приводит к госпитализации или продлению существующей стационарной госпитализации пациента.

SAE по данному критерию не являются госпитализации для проведения плановых медицинских или хирургических процедур либо курсов лечения, запланированных до подписания информированного согласия на участие в исследовании, или для проведения стандартных осмотров. Госпитализацией не считается поступление в паллиативное отделение или хосписное учреждение. Госпитализации или продленные госпитализации для запланированного по графику лечения основного рака или целевого для исследования заболевания не должны записываться как SAE.

Потеря трудоспособности/инвалидизация: АЕ, которое приводит к стойкой или значительной инвалидизации или существенному нарушению способности субъекта осуществлять нормальные жизненные функции.

Врожденная патология или порок развития:

неблагоприятный исход у ребенка или плода субъекта, подвергающегося воздействию молекулы или исследуемой схемы лечения, до зачатия или во время беременности.

Значимое с медицинской точки зрения:

АЕ не соответствует ни одному из вышеперечисленных критериев, но может поставить под угрозу субъекта и может привести к необходимости медицинского или хирургического вмешательства для предупреждения одного из вышеперечисленных исходов или предполагает подозреваемую передачу инфекционного агента посредством медицинского продукта. Потенциальное

DIU также считают значимым с медицинской точки зрения явлением.

Тяжесть нежелательного явления

[00598] Тяжесть АЕ следует оценивать с помощью CTCAE NCI версии 5.0. Данные критерии приведены в руководстве по проведению исследования.

[00599] Тяжесть и серьезность АЕ оценивают независимо. «Тяжесть» характеризует интенсивность АЕ. «Серьезное» является нормативным определением, которое служит руководством для спонсора при определении обязательств по регистрации в соответствии с нормативными требованиями (см. определение SAE выше).

Связь нежелательного явления с исследуемым лечением

[00600] Связь каждого АЕ с энфортамаба ведотином должна оцениваться исследователем с использованием следующих критериев:

Связанное: есть данные, позволяющие предположить о наличии причинно-следственной связи между лекарственным средством и АЕ, такие как:

однократный случай явления, которое является редким и известно, что оно тесно связано с воздействием лекарственного средства (например, отек Квинке, повреждение печени, синдром Стивенса-Джонсона);

один или несколько случаев явления, которое обычно не связано с воздействием лекарственного средства, но в других отношениях является редким в контингенте, который подвергается воздействию данного лекарственного средства (например, разрыв сухожилия).

Несвязанное: другая причина АЕ является более вероятной (например, вследствие основного заболевания или часто встречается у исследуемого контингента), или нельзя установить временную последовательность с началом АЕ и введением исследуемого средства лечения, или причинно-следственная связь считается биологически неправдоподобной.

(b) Процедуры выявления и регистрации нежелательных явлений

[00601] Исследователь и исследовательский персонал регистрируют все АЕ и SAE независимо от того, выявлены ли они во время опроса субъекта, обнаружены ли во время физикального обследования, либо в ходе лабораторного тестирования и/либо другими способами, путем регистрации их в форму CRF и/или SAE, в зависимости от обстоятельств.

Выявление нежелательных явлений

[00602] При каждом исследовательском визите следует использовать открытый или ненаправленный способ опроса для выявления необходимой для регистрации информации о АЕ.

Регистрация нежелательных явлений

[00603] В CRF в разделе о нежелательных явлениях должна быть зарегистрирована следующая информация:

- описание, в том числе даты начала и разрешения,
- соответствует ли оно критериям SAE,
- тяжесть,
- связь с исследуемым лечением или другая причинно-следственная связь,
- исход.

Диагноз в сравнении с признаками или симптомами

[00604] В целом предпочтительным является использование унифицированного диагноза, а не перечисления индивидуальных симптомов. Группирование симптомов в диагнозе следует проводить лишь в том случае, если каждый составляющий признак и/или симптом является подтвержденным с медицинской точки зрения компонентом диагноза, о чем указано в стандартных медицинских учебниках. Если какой-либо аспект признака или симптома не

вписывается в классическую картину диагноза, данный индивидуальный симптом регистрируют как отдельное АЕ.

Регистрация тяжелых нежелательных явлений

[00605] В случае SAE явление(явления) регистрируют как в CRF, так и в форме SAE. При регистрации SAE следует учитывать следующее:

- Исходом явления является смертельный исход. Явление, приведшее к смертельному исходу, должно быть зарегистрировано и отражено как в форме SAE, так и в CRF.
- В случаях госпитализации, хирургических или диагностических процедур в качестве SAE следует регистрировать болезнь, повлекшую за собой необходимость хирургической или диагностической процедуры, а не саму процедуру. Процедура должна быть отражена в описании как часть действий, предпринятых в ответ на болезнь.

Прогрессирование основного злокачественного новообразования

[00606] Поскольку прогрессирование основного злокачественного новообразования оценивают как переменную эффективности, о нем не следует сообщать как о АЕ или SAE. Термины «прогрессирование заболевания», «прогрессирование болезни» или «прогрессирование злокачественного заболевания» и другие подобные термины не следует использовать для описания АЕ или SAE. Однако клинические симптомы прогрессирования сообщают как АЕ или SAE, если симптом не может быть определен как исключительно обусловленный прогрессированием основного злокачественного новообразования или не соответствует ожидаемой картине прогрессирования исследуемого заболевания. Кроме того, как об АЕ или SAE следует сообщать об осложнениях, возникших в результате прогрессирования основного злокачественного новообразования.

Беременность

Уведомление о безопасности лекарственных средств

[00607] Форму регистрации беременности заполняют во всех случаях беременности, наступивших с момента введения первой дозы исследуемого лекарственного средства и до истечения 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого(-ых) лекарственного(-ых) средства(средств), в том числе любые случаи беременности, наступившие у партнерши участвующего в исследовании субъекта, который способен стать отцом ребенка. Сообщают лишь о случаях беременности, наступивших у партнерши субъекта, если предполагаемая дата зачатия приходится на период после введения субъекту первой дозы исследуемого лекарственного средства. В течение 48 часов после того, как стало известно о беременности, в отдел по исследованию безопасности лекарственных средств спонсора отправляют электронное письмо или факс. Все случаи беременности отслеживают в течение всего срока; необходимо сообщать обо всех перинатальных и неонатальных исходах. За младенцами следует проводить наблюдение в течение как минимум 8 недель.

Сбор данных по CRF

[00608] Все случаи беременности (как описано выше), наступившие в пределах 30 дней после введения последней дозы исследуемого(-ых) лекарственного(-ых) средства(средств), также регистрируют в CRF в разделе о нежелательных явлениях.

[00609] Аборт, будь то случайный, терапевтический или спонтанный, следует регистрировать как SAE. Врожденные аномалии или пороки развития, которые определены выше с помощью критерия «серьезное», следует регистрировать как SAE.

Нежелательные явления со стороны роговицы

[00610] АЕ в форме язвы роговицы или кератита со степенью ≥ 2 следует классифицировать по степени в рамках соответствующих категорий СТСАЕ NCI. АЕ в форме язвы роговицы или кератита степени 1 следует

классифицировать по степени согласно критериям «Нарушения со стороны глаз - другое, указать». Другие АЕ роговицы следует регистрировать и классифицировать по степени согласно критериям «Нарушения со стороны глаз - другое, указать».

Диабет и гипергликемия

[00611] Классификация по степени диабета должна быть основана на принципах явления «Непереносимость глюкозы» по СТСАЕ NCI v5.0. Классификация по степени гипергликемии должна быть основана на принципах явления «Гипергликемия» по СТСАЕ NCI v5.0.

Потенциальное лекарственное повреждение печени

[00612] Закон Хая применяют для оценки степени тяжести и вероятности того, что исследуемое лекарственное средство может вызвать увеличение частоты случаев тяжелой гепатотоксичности.

[00613] Отсутствие гепатотоксичности в клинических испытаниях обеспечивает ограниченную прогностическую ценность в отношении потенциального лекарственного поражения печени (DILI) в исследуемом(-ых) клиническом(-их) услови(и)ях. Тем не менее, обнаружение 1 случая по закону Хая в клинических испытаниях является угрожающим, обнаружение 2 случаев является высокопрогностическим фактором потенциального риска тяжелого DILI.

Определение

[00614] Если вкратце, потенциальные случаи по закону Хая включают в себя следующие 3 компонента:

1. Повышение аминотрансфераз (ALT и/или AST) $>3 \times \text{ULN}$ и
2. общий билирубин $>2 \times \text{ULN}$, без первоначальных свидетельств холестаза (т. е. повышенного уровня щелочной фосфатазы в сыворотке крови),

и

3. Отсутствие других сразу очевидных возможных причин повышения уровня аминотрансферазы и гипербилирубинемии, в том числе без исключения вирусного гепатита, ранее существовавшего хронического или острого заболевания печени или введения другого(-их) лекарственного(-ых) средства(средств), о котором(-ых) известно, что оно(они) является(являются) гепатотоксичным(-и).

Случаи необходимости сообщения о ситуации

[00615] Любой потенциальный случай по закону Хая следует рассматривать как SAE и незамедлительно сообщать спонсору.

[00616] Сообщения должны включать всю доступную информацию и должны инициировать тщательное последующее наблюдение до полного разрешения проблемы и завершения всех попыток получить дополнительные данные.

Последующее наблюдение за отклоняющимися от нормы результатами лабораторных исследований, свидетельствующими о потенциальном DILI

[00617] Как правило, повышение уровня ALT или AST в сыворотке крови $>3 \times \text{ULN}$ должно сопровождаться повторным тестированием в пределах 48-72 часов ALT, AST, щелочной фосфатазы и общего билирубина в сыворотке крови для подтверждения отклонений и определения, не ухудшаются ли данные показатели.

[00618] Необходимо начать соответствующую медицинскую оценку для изучения потенциальных искажающих факторов и альтернативных причин гепатотоксичности. В ходе данного изучения необходимо рассмотреть возможность приостановки введения исследуемого лекарственного средства.

(с) Периоды регистрации сообщений о нежелательных явлениях и серьезных нежелательных явлениях

[00619] Период регистрации сообщений по безопасности для всех АЕ и SAE начинается с дня 1 исследования (до введения дозы) и заканчивается через 30 дней после последнего сеанса исследуемого лечения. Тем не менее, с момента информированного согласия регистрируют все АЕ, связанные с протоколом исследования. Спонсору также следует сообщать обо всех случаях SAE, возникающих после периода регистрации сообщений по безопасности и считающихся, по мнению исследователя, связанными с исследуемым лечением.

[00620] За SAE проводят последующее наблюдение до тех пор, пока значительные изменения не вернутся к исходному уровню, явление не стабилизируется (произойдет восстановление/разрешение) или не перестанет считаться исследователем клинически значимым, либо пока субъект не умрет или не отзовет свое согласие. Все несерьезные АЕ отслеживают в течение периода регистрации сообщений по безопасности. За определенными несерьезными представляющими интерес АЕ ведут наблюдение до разрешения, возврата к исходному уровню или закрытия исследования.

(d) В случае серьезных нежелательных явлений необходимо немедленное сообщение

[00621] В течение 24 часов после наблюдения или изучения SAE исследователи сообщают о нем спонсору, независимо от связи явления с исследуемой схемой лечения.

[00622] В случае первоначальных сообщений о SAE доступные сведения о случае регистрируют в форме о SAE. Как минимум, должно быть включено следующее:

- номер субъекта,
- дата начала явления,
- описание явления,
- исследуемое лечение, если известно,

- оценка причинно-следственной связи следователем.

[00623] Заполненную форму SAE отправляют по электронной почте или по факсу в Отдел безопасности лекарственных средств спонсора в течение 24 часов (см. электронную почту или номер факса, указанные в форме сообщения об SAE).

[00624] Соответствующую информацию о последующем наблюдении передают спонсору, как только она становится доступной.

(e) Отчетность спонсора по безопасности в регуляторные органы

[00625] Исследователи должны отчитываться спонсору обо всех SAE. Спонсор докладывает обо всех SAE, в том числе предполагаемых непредвиденных серьезных неблагоприятных реакциях (SUSAR), в регуляторные органы в соответствии с требованиями местного законодательства или нормативными требованиями по подаче отчетности.

(f) Нежелательные явления, представляющие особый интерес

[00626] Определенные несерьезные нежелательные явления, представляющие особый интерес (AESI), отслеживают (включая сбор соответствующих сопутствующих лекарственных препаратов) до разрешения, возвращения к исходному уровню, прекращения участия субъектов, закрытия исследования или до тех пор, пока явления не станут хроническими в той степени, в которой они надлежащим образом охарактеризованы.

[00627] AESI, связанные с энфортумаба ведотином для данной цели, включают без ограничения те явления, которые указаны ниже в перечне:

- кожные реакции,
- периферическую нейропатию,
- связанное с роковицей явление,

- гипергликемию.

[00628] О случаях AESI следует незамедлительно сообщать посредством электронного сбора данных (EDC). Если явление соответствует критериям серьезного явления, о нем следует сообщить как о серьезном явлении в течение 24 часов.

(ii) Показатели жизненно важных функций

[00629] Показатели жизненно важных функций включают частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое кровяное давление и температуру. Регистрируют значения жизненно важных показателей, а любой диагноз, связанный с клинически значимыми отклонениями жизненно важных показателей, регистрируют как АЕ или ранее существовавшее патологическое состояние.

(iii) Клинические лабораторные тесты

[00630] Берут образцы для местных лабораторий. Местное лабораторное тестирование включает институциональные стандартные тесты для оценки безопасности и принятия клинических решений. Местными лабораториями для оценки безопасности в запланированные графиком моменты времени (см. График мероприятий) в ходе исследования проводят следующие лабораторные оценки:

- развернутый биохимический анализ сыворотки крови, который включает следующие тесты: альбумин, щелочную фосфатазу, ALT, AST, бикарбонат, азот мочевины крови, кальций, креатинин, хлорид, лактатдегидрогеназу (LDH), фосфор, калий, натрий, общий билирубин, амилазу, липазу, глюкозу и мочевую кислоту,
- HbA1c,
- глюкозу (до введения дозы необходимо убедиться, что она составляет <250 мг/дл, путем взятия крови из вены либо взятия из пальца),

- CBC с подсчетом форменных элементов, который включает следующие тесты: количество лейкоцитов с пятичастным подсчетом форменных элементов (нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов), количество тромбоцитов, Hgb и гематокрит,
- расчетный CrCl (вместо креатинина или CrCl также можно использовать GFR). CrCl следует рассчитывать с помощью способа Кокрофта-Голта или уравнений MDRD.

[00631] Местными лабораториями для оценки безопасности в запланированные графиком моменты времени (см. График мероприятий) в ходе исследования проводят следующую(-ие) лабораторную(-ые) оценку(-и):

- серологию (гепатит В и С),
- PT/PTT/INR,
- анализ мочи
- стандартный анализ мочи (с рефлекторной микроскопией, если есть отклонения от нормы),
- тест на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче для субъектов с репродуктивным потенциалом.

(iv) Физикальное обследование

[00632] Физикальные обследования должны включать оценки следующих частей/систем тела: брюшной полости, конечностей, головы, сердца, легких, шеи и неврологического статуса. Также измеряется вес и рост. Используют результаты измерения роста, полученные в течение предыдущих 12 месяцев.

[00633] Перед каждой внутривузырной инстилляцией энфортумаба ведотина предлагаемые вопросы, задаваемые субъекту, могут включать любые вопросы о новых или текущих симптомах, таких как боль в животе (особенно в нижней части живота, боку или уретре), лихорадка, озноб, симптомы,

свидетельствующие о непроходимости, кожная сыпь, и необходимо проверить наличие признаков кровотечения (минимальную или грубую гематурию, тромбы). Если общая клиническая оценка позволяет предположить наличие АЕ, дальнейшее лечение следует приостановить до разрешения симптомов по усмотрению лечащего исследователя.

(v) Функциональный статус по ECOG

[00634] Функциональный статус по ECOG будут оценивать в указанные в протоколе моменты времени.

(vi) Электрокардиограммы

[00635] Всем субъектам на этапе скрининга трижды делают ECG в 12 отведениях. При наличии клинических показаний следует провести дополнительные ECG. ECG проводят после того, как субъект пробыл в положении лежа в течение по меньшей мере 5 минут. По возможности ECG следует проводить до получения образцов биомаркеров.

[00636] В периодах ожидания между каждой ECG нет необходимости. Электронные или бумажные копии записей передают уполномоченному спонсора для возможной централизованной оценки.

(vii) Тестирование на беременность

[00637] Для субъектов с репродуктивным потенциалом тест на беременность на β -hCG в сыворотке крови или моче с чувствительностью по меньшей мере 25 мМЕ/мл проводят на исходном уровне, в день 1 исследования на неделях 1, 3, 6 и 9 во время индукции, в день 1 исследования каждого месяца во время фазы поддержания дозы, в ходе визита ЕОТ и ежемесячно в течение 6 месяцев после введения последней дозы энфортумаба ведотина. Прежде чем субъект сможет получить исследуемое лекарственное средство, необходим отрицательный результат по беременности. Тесты на беременность также могут быть повторены

по требованию Институционального наблюдательного совета/независимого комитета по этике (IRB/IEC) или если этого требуют местные нормы.

(viii) Визуализация

[00638] Субъектов подвергают СТ- или MRI-урографии верхних отделов мочеточника, брюшной полости и таза, а также визуализации грудной клетки на этапе скрининга. Если субъект не может переносить IV контрастирование, допускается проведение СТ без контрастирования. Для визуализации верхних отделов мочеточника, брюшной полости и таза допустимо получение СТ- или MRI-урограммы с контрастированием (если нет медицинских противопоказаний). Предыдущую визуализацию аналогичной методикой используют, если она выполнена в пределах 3 месяцев до начала исследуемого лечения.

(ix) Полное обследование глаз

[00639] Субъекты на этапе скрининга проходят полное обследование глаз, проводимое квалифицированным оптометристом или офтальмологом, в том числе без ограничения проверку остроты зрения, обследование глаза с помощью щелевой лампы, тонометрическое обследование и обследование расширенного глазного дна. Последующие обследования глаз проводят по клиническим показаниям. Обследования с помощью щелевой лампы в ЕОТ необходимы для субъектов, которые во время исследования испытывают АЕ на роговице, и должны быть проведены по меньшей мере через 4 недели после последней дозы.

6.2.8.8 *Оценки после лечения*

(i) Оценки в ходе последующего наблюдения

[00640] Субъекты, которые прекращают исследуемое лечение по причинам, отличным от персистенции, рецидива или прогрессирования заболевания, и субъекты, завершившие фазу поддержания дозы, входят в фазу последующего наблюдения в ходе исследования. Физикальное обследование, анализ мочи и

тест на беременность проводят так, как указано в Графике мероприятий. Визуализацию проводят в том случае, если есть клинические показания. В ходе периода последующего наблюдения оценка ответа опухоли с помощью цистоскопии после стандартного средства лечения (т. е. цистоскопии ± биопсии) и цитологическое исследование будут проведены каждые 3 месяца с момента первой индукционной дозы в течение первых 2 лет после набора для участия в исследовании и каждые 6 месяцев в дальнейшем в течение 5 лет после набора для участия в исследовании до рецидива, прогрессирования заболевания, начала последующей противораковой терапии или смертельного исхода, в зависимости от того, что наступит раньше.

(ii) Оценки в ходе последующего наблюдения за продолжительностью жизни

[00641] После досрочного завершения исследуемого лечения по причине персистенции, рецидива, прогрессирования заболевания или начала последующей противораковой терапии субъекты входят в период последующего наблюдения за продолжительностью жизни. Данные о продолжительности жизни и последующей противораковой терапии собирают каждые 6 месяцев (± 2 недели) до прекращения последующего наблюдения, отзыва согласия, смертельного исхода или прекращения исследования спонсором, в зависимости от того, что наступит раньше, в течение максимум 5 лет после набора для участия в исследовании.

6.2.8.9 *Соответствие показателей*

[00642] Показатели безопасности, используемые в данном испытании, считаются стандартными процедурами оценки потенциальных нежелательных эффектов исследуемых лекарственных препаратов.

[00643] Ответ оценивают с помощью цистоскопии ± биопсии и цитологии, что является стандартом для оценки ответа при NMIBC. Интервалы оценки в данном протоколе считают подходящими для контроля заболевания.

[00644] Иммуногенность обычно оценивают для биологических препаратов, поэтому проводят стандартные тесты для обнаружения возможного наличия специфических антител к энфортумаба ведотину. В клинических исследованиях также широко используют фармакокинетические оценки, чтобы помочь охарактеризовать различные виды взаимосвязи дозы, концентрации и ответа.

6.2.9 СПОСОБЫ АНАЛИЗА ДАННЫХ

6.2.9.1 *Определение размера образца*

[00645] В данном исследовании набирают примерно 58 субъектов. Сюда относятся примерно 18 субъектов, подвергаемых оценке при увеличении доз, и примерно 40 субъектов, подвергаемых оценке в максимум 2 группах по изучению расширения периода введения доз (20 субъектов в каждой когорте).

[00646] Точное количество субъектов, необходимое для завершения стадии повышения доз, неизвестно, поскольку оно зависит от количества уровней дозы, подвергаемых оценке до достижения MTD, и количества субъектов, подвергаемых лечению на каждом уровне дозы.

[00647] Никакой формальной проверки гипотез для когорты для изучения расширения периода введения доз не запланировано. С учетом того, что наблюдаемая частота CR находится в диапазоне от 30% до 50%, 95% и 80%, точные CI с 20 субъектами на когорту подытожены выше в таблице 11.

6.2.9.2 *Определения конечных точек исследования*

[00648] Конечные точки исследования представлены в разделе 6.1.3 «Цели». Определения конечных точек представлены в данном разделе.

(i) Частота полного ответа

[00649] Частоту CR определяют как долю субъектов, достигших CR.

[00650] Субъектов будут считать имеющими CR, если у них присутствуют все представленные далее результаты.

1. Цистоскопия: нормальный внешний вид мочевого пузыря. В случае патологического внешнего вида мочевого пузыря при цистоскопии результаты проведенных биопсий являются отрицательными или свидетельствуют о низком уровне Та, папиллярном уротелиальном новообразовании любой степени тяжести с низким потенциалом или папилломе любой степени. Если производят случайные биопсии мочевого пузыря, данные биопсии должны давать отрицательный результат или свидетельствовать о заболевании с низкой степенью тяжести.

2. Цитологическое исследование мочи: отрицательный результат.

a. Результаты цитологического исследования мочи, которые не являются убедительными, необходимо подвергнуть оценке.

b. Положительный результат цитологического исследования мочи необходимо дополнительно оценить в клинических условиях с помощью цистоскопии ± биопсии и визуализации.

3. Визуализация (при ее проведении): норма или, если обнаружена патология, результаты должны подтверждать CR в мочевом пузыре.

[00651] В связи с внутривезикулярным введением исследуемого средства лечения считается, что у субъекта есть CR, если у него отрицательный результат цистоскопии с результатом цитологического исследования мочи, указывающим на наличие злокачественного новообразования, если рак обнаружен в верхних отделах мочеточника или простатической части уретры, а результаты случайной биопсии мочевого пузыря являются отрицательными.

[00652] Субъектов, у которых отсутствует оценка ответа после исходного уровня, считают не достигшими CR.

(ii) Продолжительность полного ответа

[00653] Продолжительность CR определяют как время от первого задокументированного CR до первых признаков рецидива, прогрессирования

или смертельного исхода по любой причине, в зависимости от того, что наступит раньше.

[00654] Субъекты, которые достигают CR, живы и не имеют рецидива и прогрессирования заболевания на момент анализа, будут подвергнуты цензуре при последней оценке заболевания. Подробные правила цензурирования представлены в плане статистического анализа (SAP).

(iii) Частота цистэктомии

[00655] Частоту цистэктомии определяют как долю субъектов, которые впоследствии были подвергнуты цистэктомии.

(iv) Продолжительность жизни без прогрессирования

[00656] Продолжительность жизни без прогрессирования (PFS) определяют как время от начала исследуемого лечения до первых признаков прогрессирования или смертельного исхода по любой причине, в зависимости от того, что наступит раньше. Субъектов, которые не имеют рецидива и прогрессирования заболевания на момент анализа, цензурят при последней оценке заболевания. Подробные правила цензурирования представлены в SAP.

(v) Продолжительность жизни без цистэктомии

[00657] Продолжительность жизни без цистэктомии (CFS) определяют как время от начала исследуемого лечения до цистэктомии или смертельного исхода по любой причине, в зависимости от того, что наступит раньше. Субъектов, которые не имеют рецидива и цистэктомии заболевания на момент анализа, цензурят на последнюю дату взаимодействия. Подробные правила цензурирования представлены в SAP.

6.2.9.3 *Статистические и аналитические планы*

[00658] Далее кратко изложены высокоуровневые статистические и аналитические планы. Более подробные и полные планы будут представлены в SAP.

(i) Общие факты

[00659] Данное исследование является исследованием 1-й фазы с когортами с увеличением доз с последующим расширением периода лечения. Все результаты анализа носят описательный характер.

[00660] Описательная статистика (среднее, медианное, стандартное отклонение, минимум, максимум) применяют для описания непрерывных переменных. Значения частоты и процентов применяют для описания категориальных переменных.

(a) Рандомизация и анонимизация

[00661] Это открытое исследование с повышением дозы и расширением периода введения доз. Не задействуют рандомизацию и не используют анонимизацию.

(b) Корректировки по ковариатам

[00662] Корректировки по ковариатам не запланированы.

(c) Обработка исключений и отсутствующих данных

[00663] Отсутствующие данные должны быть условно исчислены, если не указано иное. Отсутствующие даты начала и окончания АЕ вводят с целью расчета продолжительности явлений и статуса ТЕ. Подробности об обработке отсутствующих данных представлена в SAP.

(d) Исследования в нескольких центрах

[00664] В данном исследовании участвуют несколько исследовательских центров, однако не ожидается, что в каком-либо исследовательском центре

будет собрано достаточное количество субъектов для гарантии проведения центрального анализа.

(e) Множественные сравнения и множественность

[00665] В данном исследовании 1-й фазы не запланировано никаких множественных сравнений и нет необходимости в альфа-корректировке.

(f) Преобразования и вывод данных

[00666] Временные переменные на основе 2 дат (например, дате начала и дате окончания) рассчитывают как (дата окончания - дата начала +1) (в днях), если иное не указано в плане анализа.

[00667] Значения на исходном уровне, применяемые во всех статистических анализах, представляют собой наиболее свежие непропущенные результаты измерения до введения первой дозы исследуемого лекарственного средства, если иное не указано в плане анализа.

(g) Аналитические группы

Аналитические группы анализа всех подвергаемых лечению субъектов

[00668] Аналитическая группа всех подвергаемых лечению субъектов (ATS) включает всех субъектов, которые получают любое количество энфортумаба ведотина. Аналитическую группу ATS применяют для анализа конечных точек по безопасности и эффективности.

Аналитическая группа поддающихся оценке по DLT

[00669] Аналитическая группа по изучению DE включает всех субъектов, получавших лечение при увеличении доз, которые либо испытали DLT, либо получили по меньшей мере 5 индукционных доз энфортумаба ведотина. Аналитическую группу по изучению DE используют для определения MTD.

(h) Изучение подгрупп

[00670] В качестве исследовательского анализа проводят анализ подгрупп для выбранных конечных точек. Подгруппы могут включать без ограничения следующее:

- предыдущие курсы терапии,
- подтип заболевания,
- уровень экспрессии нектин-4,

(i) Периоды проведения анализов.

[00671] Окончательный анализ данного исследования проходит после того, как все субъекты завершили свое лечение и период последующего наблюдения, или после прекращения исследования спонсором.

(ii) Распределение участников клинического исследования

[00672] Учет субъектов исследования по распределению сводят в таблице и подводят общую сводку количества субъектов в каждой аналитической группе. Субъектов, которые досрочно завершают исследуемое лечение, и субъектов, которые отзывают согласие на участие в исследовании, обобщают с указанием причины досрочного завершения или отзыва согласия.

(iii) Характеристики субъектов

[00673] Обобщают демографические и другие характеристики на исходном уровне. Подробности приводят в SAP.

(iv) Соблюдение режима лечения

[00674] Исследуемое лекарственное средство вводят внутривенно в исследовательском центре. Не запланировано никакого заключения о соблюдении режима лечения.

(v) Анализы эффективности

[00675] Все анализы эффективности проводят с использованием аналитических групп ATS.

[00676] Частоту CR в любой момент времени в ходе исследования и значения частоты CR через 3, 6, 12, 18 и 24 месяца обобщают вместе с точными 95% CI.

[00677] Продолжительность CR оценивают с помощью способа Каплана-Мейера. В анализ включают только субъектов, достигающих CR.

[00678] PFS и CFS оценивают с помощью способа Каплана-Мейера. Графики по способу Каплана-Мейера будут представлены при необходимости. Подробная методология представлена в SAP.

[00679] Частота цистэктомии подытожена с точностью до 95% CI.

(vi) Анализы фармакокинетики и иммуногенности

[00680] Значения концентрации энфортумаба ведотина в крови и моче подытоживают с описательной статистикой в каждый момент времени взятия образца для изучения PK. Подлежащие расчету дозозависимые PK-параметры могут включать без ограничения AUC, C_{max}, T_{max}, t_{1/2} и C_{trough}, и их оценивают с помощью некомпартментного анализа и суммируют с помощью описательной статистики. При необходимости оценивают дополнительные анализы. Изучают взаимосвязь между PK- и фармакодинамическими конечными точками, безопасностью или эффективностью.

[00681] Частоту АТА обобщают с помощью описательной статистики.

(vii) Анализы биомаркеров

[00682] Изучают связи параметров биомаркеров (например, значений на исходном уровне, абсолютных и относительных изменений относительно исходного уровня) с противоопухолевой активностью, безопасностью и PK-параметрами. Сводят взаимосвязи и связанные с ними данные, которые

определяют как представляющие интерес. Подробности описаны отдельно в плане по SAP или анализу биомаркеров.

(viii) Анализ сообщаемых пациентами результатов

[00683] Сообщаемые пациентами результаты собирают посредством интервьюирования субъектов. Результаты анализа записей, которые будут получены по результатам данных интервью, описаны в отдельном документе.

(ix) Анализы безопасности

[00684] Все анализы безопасности проводят с использованием аналитических групп ATS.

(a) Степень воздействия

[00685] Обобщают продолжительность лечения, количество доз, общую дозу и интенсивность доз. Обобщают модификации доз, в том числе задержку введения доз, пропуск введения доз и снижение дозы. Подробности приводят в SAP.

(b) Нежелательные явления

[00686] Обзор АЕ представляет собой таблицу частоты всех возникших в ходе лечения нежелательных явлений (ТЕАЕ), связанных с лечением ТЕАЕ, ТЕАЕ 3-й или выше степени, связанных с лечением ТЕАЕ 3-й или выше степени, ТЕ СНЯ, связанных с лечением ТЕ SAE, ТЕАЕ, приводящих к смертельному исходу, связанных с лечением ТЕАЕ, приводящих к смертельному исходу, ТЕАЕ, приводящих к досрочному завершению лечения, и связанных с лечением ТЕАЕ, приводящих к досрочному завершению лечения. АЕ определяют как возникшие в ходе лечения, если они возникают впервые или ухудшаются после первой дозы исследуемого средства лечения и через 30 дней или ранее после введения последней дозы.

[00687] Итог по ТЕАЕ сводят в соответствии с предпочтительным термином, степенью тяжести и связью с исследуемым лекарственным средством по

Медицинскому словарю терминологии нежелательных явлений (MedDRA). В случае многократного появления одного и того же АЕ с одним и тем же предпочтительным термином у 1 субъекта АЕ засчитывают как однократное появление. Итог по ТЕАЕ, приводящим к изменению дозы или досрочному завершению лечения, сводят таким же образом.

[00688] Перечисляют все ТЕАЕ, ТЕАЕ 3-й степени или выше, а также ТЕАЕ, приводящие к досрочному завершению лечения.

(c) Дозолимитирующая токсичность

[00689] Количество и процент субъектов, испытывающих DLT, сводят для выборки для анализа DE. Для каждого уровня дозы представляют модельную оценку вероятности DLT вместе с 95% доверительным интервалом.

(d) Смертельные случаи и серьезные нежелательные явления

[00690] SAE перечисляют и обобщают так же, как и ТЕАЕ. Перечисляют явления с летальным исходом.

(e) Клинические лабораторные результаты

[00691] Лабораторные показатели (например, результаты биохимических, гематологических тестов и анализа мочи) сводят по каждому визиту. Смещения относительно исходного уровня до максимальной степени СТСАЕ NCI после исходного уровня сводят в таблицу.

[00692] Лабораторные показатели представляют с указанием степени по СТСАЕ NCI и отмечают, когда значения выходят за пределы нормального референсного диапазона.

(f) Другие анализы безопасности

Показатели жизненно важных функций

[00693] Приводят результаты измерений показателей жизненно важных функций (систолическое и диастолическое кровяное давление, частоту сердечных сокращений и температуру).

Функциональный статус по ECOG

[00694] Смещения относительно исходного уровня к лучшей и худшей оценке в баллах после исходного уровня сводят в таблицу.

ECG

[00695] Перечисляют статусы ECG (нормальные, клинически значимые отклонения от нормы или клинически не значимые отклонения от нормы).

(x) Промежуточные анализы

[00696] Никаких официальных промежуточных анализов не запланировано. Для определения DLT и принятия решений по повышению дозы во время части исследования с повышением доз данные оцениваются спонсором и SMC после каждой когорты. SMC постоянно проводит наблюдения в ходе исследования на предмет безопасности и DLT.

[00697] Процесс принятия решений SMC, а также роли и обязанности SMC подробно описаны в отдельном документе.

[00698] Промежуточные данные, полученные в ходе исследования, представляют на научных конференциях, таких как ежегодные собрания Американского общества клинической онкологии.

6.2.10 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ ТЕРМИНОВ

ADC	конъюгат антитела с лекарственным средством
AE	нежелательное явление
AESI	представляющее особый интерес нежелательное явление
ALT	аланинаминотрансфераза
ANC	абсолютное количество нейтрофилов

aPTT	активированное частичное тромбопластиновое время
AST	аспартатаминотрансфераза
ATA	антитело к исследуемому терапевтическому средству
ATS	все субъекты, получавшие лечение
AUA	Американская урологическая ассоциация
AUC	площадь под кривой зависимости концентрации от времени
β -hCG	бета-хорионический гонадотропин человека
BCG	бацилла Кальмета-Герена
BICR	замаскированный независимый централизованный обзор
C _{max}	максимальная концентрация
CrCl	клиренс креатинина
C _{trough}	остаточная концентрация
CBC	клинический анализ крови
CFS	продолжительность жизни без цистэктомии
CI	доверительный интервал
CIS	карцинома in situ
CR	полный ответ
CRF	индивидуальная регистрационная карта
CT	компьютерная томография
CYP	цитохром P450
DE	поддающийся оценке по DLT
DILI	лекарственное повреждение печени
DLT	дозолимитирующая токсичность
DOR	продолжительность ответа
DU	текущая доза неприемлемо токсична
EAU	Европейская ассоциация урологов
ECD	внеклеточный домен
ECG	электрокардиограмма
ECOG	Восточная объединенная онкологическая группа
eCRF	электронная индивидуальная регистрационная карта
ELISA	твердофазные иммуноферментные анализы

EOT	окончание лечения
FIN	проводимый впервые на людях
GFR	скорость клубочковой фильтрации
HbA1c	гемоглобин A1c
Hgb	гемоглобин
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
HR	коэффициент риска
ICH	Международный совет по гармонизации
IEC	независимый комитет по этике
Ig	иммуноглобулин
IND	новое исследуемое лекарственное средство
IRB	Институциональный наблюдательный совет
IRR	связанная с инфузией реакция
IV	внутривенное
LDH	лактатдегидрогеназа
mAB	моноклональное антитело
MDRD	модификация диеты при заболеваниях почек
MedDRA	Медицинский словарь терминологии нежелательных явлений
MMAE	монометилауристатин E
MRHD	максимальная рекомендуемая для человека доза
MRI	магнитно-резонансная томография
MTD	максимальная переносимая доза
mTPI	модифицированный интервал вероятности токсичности
CTCAE NCI	Общие терминологические критерии нежелательных явлений Национального института онкологии
NMIBC	рак мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой
NOAEL	уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов
NYHA	Нью-Йоркская кардиологическая ассоциация
ORR	частота объективных ответов
OS	общая продолжительность жизни
PACS	система архивирования и передачи изображений

ПЦР	полимеразная цепная реакция
PD-1	белок 1 запрограммированной гибели клеток
PD-L1	лиганд 1 запрограммированной гибели
PFS	продолжительность жизни без прогрессирования
P-gp	P-гликопротеин
PK	фармакокинетика
PK/PD	фармакокинетика/фармакодинамика
PN	периферическая нейропатия
PSA	простатспецифический антиген
PT/PTT/INR	протромбиновое время/частичное тромбластиновое время/международный нормализационный индекс q1wk раз в неделю
SAE	серьезное нежелательное явление
SAP	план статистического анализа
SJS	синдром Стивенса-Джонсона
SMC	комитет по наблюдению за безопасностью
SUSAR	подозреваемые неожиданные серьезные нежелательные реакции
t _{1/2}	период полужизни
TAб	общее антитело
TE	неотложное лечение
TEAE	нежелательное явление, возникшее в ходе лечения
TEN	токсический эпидермальный некролиз
T _{max}	время достижения максимальной концентрации
TURBT	трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря
UC	уротелиальный рак
ULN	верхний предел нормы
США	Соединенные Штаты Америки
UTI	инфекция мочевыводящих путей

Опубликованная формула изобретения

1. Способ лечения рака мочевого пузыря у субъекта-человека, предусматривающий внутривезикулярное введение субъекту эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), где ADC содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 191P4D12 и конъюгированы с одним или несколькими звеньями монометилауристатина E (MMAE).
2. Способ по п. 1, где рак мочевого пузыря представляет собой рак мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (NMIBC).
3. Способ по п. 2, где NMIBC был подтвержден гистологическим методом и представляет собой карциному *in situ* (CIS).
4. Способ по п. 3, где у субъекта имеется папиллярное заболевание.
5. Способ по п. 3, где у субъекта нет папиллярного заболевания.
6. Способ по любому из пп. 2-5, где NMIBC был подтвержден гистологическим методом и где преобладающим гистологическим компонентом (>50%) является уротелиальная (переходно-клеточная) карцинома.
7. Способ по любому из пп. 1-6, где у субъекта имеется высокий риск развития заболевания, не дающего ответ на бациллу Кальмета-Герена (BCG).
8. Способ по любому из пп. 1-7, где для субъекта недопустима радикальная цистэктомия или он отказывается от нее.
9. Способ по любому из пп. 1-8, где все видимые папиллярные опухоли Ta/T1 у субъекта были полностью удалены посредством резекции в пределах 60 дней до лечения.
10. Способ по п. 9, где у субъекта имеется остаточная истинная CIS.
11. Способ по п. 9, где у субъекта нет остаточной истинной CIS.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где субъект имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 0.

13. Способ по любому из пп. 1-11, где субъект имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 1.

14. Способ по любому из пп. 1-11, где субъект имеет оценку в баллах функционального статуса по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG), равную 2.

15. Способ по п. 14, где скорость клубочковой фильтрации (GFR) у субъекта составляет не менее 50 мл/мин и у субъекта нет сердечной недостаточности III класса по системе Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).

16. Способ по любому из пп. 1-15, где у субъекта имеется одно или несколько патологических состояний, выбранных из группы, состоящей из следующих:

- a. абсолютное количество нейтрофилов (ANC) ≥ 1500 /мкл;
- b. гемоглобин (Hgb) ≥ 10 г/дл;
- c. количество тромбоцитов ≥ 100000 /мкл;
- d. сывороточный билирубин $\leq 1,5 \times$ верхнего предела нормы (ULN) или $\leq 3 \times$ ULN для субъектов с болезнью Жильбера;
- e. расчетный клиренс креатинина (CrCl) ≥ 30 мл/мин (вместо креатинина или CrCl также можно использовать GFR); CrCl следует рассчитывать с помощью способа Кокрофта-Голта или уравнений модификации диеты при заболеваниях почек (MDRD); субъекты с функциональным статусом по ECOG, равным 2, должны иметь GFR ≥ 50 мл/мин;
- f. аланинаминотрансфераза (ALT) и аспартатаминотрансфераза (AST) $\leq 3 \times$ ULN; или

g. международный нормализационный индекс (INR) или протромбиновое время (PT), активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT) или частичное тромбопластиновое время (PTT) $\leq 1,5$ ULN, если только субъект не получает антикоагулянтную терапию, при условии, что PT или aPTT находится в пределах терапевтического диапазона предусмотренного применения антикоагулянтов.

17. Способ по п. 16, где у субъекта имеются все патологические состояния (a)-(g) по п. 16.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где расчетная продолжительность жизни субъекта составляет более 2 лет.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка тяжелой цепи, изложенного под SEQ ID NO:22, и переменный участок легкой цепи, содержащий CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR переменного участка легкой цепи, изложенного под SEQ ID NO:23.

20. Способ по любому из пп. 1-19,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:9, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10, CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11; CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:13, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:14, или

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:16, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:17, CDR-H3,

содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:18; CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:19, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:21.

21. Способ по любому из пп. 1-19,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:9, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:10, CDR-H3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:11; CDR-L1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:12, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:13, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:14, или

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:16, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:17, CDR-H3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:18; CDR-L1, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:19, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:21.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:22, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:23.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')₂, Fv или scFv.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где антитело представляет собой IgG1, а легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь.

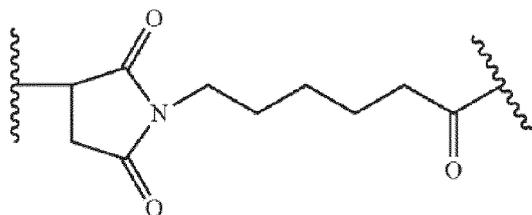
27. Способ по любому из пп. 1-26, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получены рекомбинантным методом.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с каждым звеном MMAE посредством линкера.

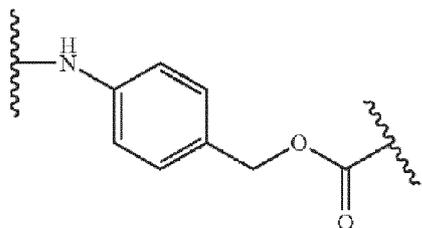
29. Способ по п. 28, где линкер представляет собой расщепляемый ферментом линкер, и где линкер образует связь с атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

30. Способ по п. 28 или п. 29, где линкер характеризуется следующей формулой: -Aa-Ww-Yu-; где -A- обозначает растягивающееся звено, а равно 0 или 1; -W- обозначает аминокислотное звено, w обозначает целое число от 0 до 12; и -Y- обозначает спейсерное звено, у равно 0, 1 или 2.

31. Способ по п. 30, где растягивающееся звено характеризуется структурой с представленной ниже формулой (1), аминокислотное звено представляет собой валин-цитруллин, а спейсерное звено представляет собой группу PAB, содержащую структуру с представленной ниже формулой (2):

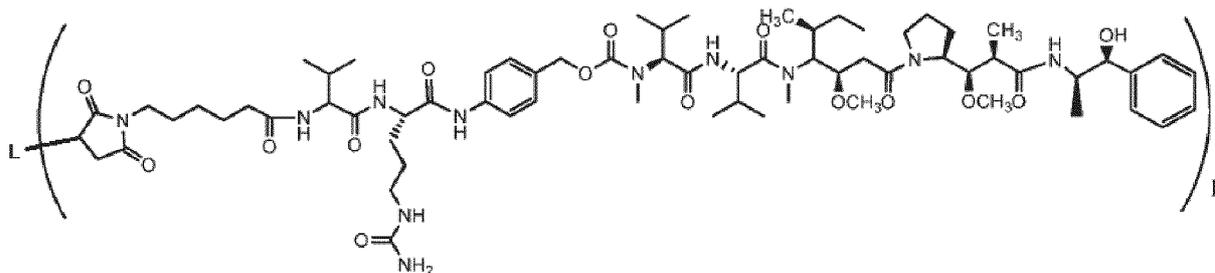


Формула (1)



Формула (2).

32. Способ по п. 30 или п. 31, где растягивающееся звено образует связь с атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где спейсерное звено связано с MMAE посредством карбаматной группы.
33. Способ по любому из пп. 1-32, где ADC содержит от 1 до 20 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
34. Способ по любому из пп. 1-33, где ADC содержит от 1 до 10 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
35. Способ по любому из пп. 1-34, где ADC содержит от 2 до 8 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
36. Способ по любому из пп. 1-35, где ADC содержит от 3 до 5 звеньев MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
37. Способ по любому из пп. 1-36, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а р равно от 1 до 10.

38. Способ по п. 37, где р равно от 2 до 8.
39. Способ по п. 37 или п. 38, где р равно от 3 до 5.
40. Способ по любому из пп. 37-39, где р равно от 3 до 4.
41. Способ по любому из пп. 37-40, где р равно приблизительно 4.
42. Способ по любому из пп. 37-40, где среднее значение р эффективного количества конъюгатов антитела с лекарственным средством равно приблизительно 3,8.
43. Способ по любому из пп. 1-42, где ADC составлен в фармацевтическую композицию, содержащую L-гистидин, полисорбат-20 (твин-20) и дегидрат трегалозы.
44. Способ по любому из пп. 1-43, где ADC составлен в фармацевтическую композицию, содержащую приблизительно 20 мМ L-гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем) твина-20, приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы и гидрохлорид, и где рН фармацевтической композиции составляет приблизительно 6,0 при 25°C.
45. Способ по любому из пп. 1-43, где ADC составлен в фармацевтическую композицию, содержащую приблизительно 9 мМ гистидина, приблизительно 11 мМ моногидрата гидрохлорида гистидина, приблизительно 0,02% (вес/объем)

твина-20 и приблизительно 5,5% (вес/объем) дигидрата трегалозы, и где pH фармацевтической композиции составляет приблизительно 6,0 при 25°C.

46. Способ по любому из пп. 1-45, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую от приблизительно 100 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 125 мг до приблизительно 950 мг, от приблизительно 125 мг до приблизительно 900 мг, от приблизительно 125 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 125 мг до приблизительно 800 мг или от приблизительно 125 мг до приблизительно 750 мг, с объемом инстиляции, составляющим от приблизительно 10 мл до приблизительно 100 мл.

47. Способ по любому из пп. 1-46, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую от приблизительно 125 мг до приблизительно 750 мг, с объемом инстиляции, составляющим приблизительно 25 мл.

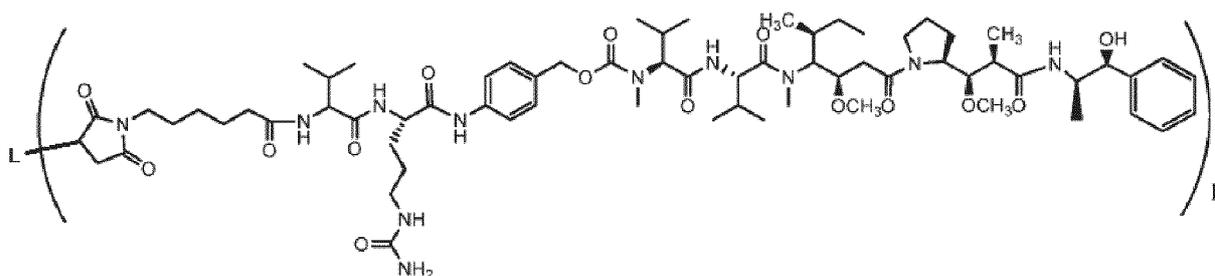
48. Способ по любому из пп. 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 125 мг, с объемом инстиляции, составляющим приблизительно 25 мл.

49. Способ по любому из пп. 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 250 мг, с объемом инстиляции, составляющим приблизительно 25 мл.

50. Способ по любому из пп. 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 500 мг, с объемом инстиляции, составляющим приблизительно 25 мл.

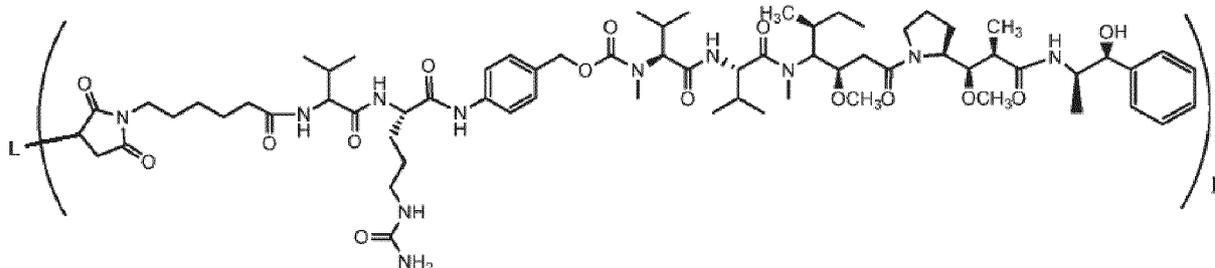
51. Способ по любому из пп. 1-47, где эффективное количество ADC представляет собой дозу, составляющую приблизительно 750 мг, с объемом инстиляции, составляющим приблизительно 25 мл.

52. Способ по любому из пп. 1-51, где максимальное время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 90 минут.
53. Способ по любому из пп. 1-51, где максимальное время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 120 минут.
54. Способ по любому из пп. 1-51, где время пребывания в организме после каждого внутрипузырного введения составляет приблизительно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 120 минут.
55. Способ по любому из пп. 1-54, где ADC вводят внутрипузырно в течение двух фаз, где две фазы представляют собой фазу индукции и фазу поддержания дозы.
56. Способ по п. 55, где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель, в период от шести до девяти недель или в период от шести до восьми недель после фазы индукции.
57. Способ по п. 55 или п. 56, где ADC вводят внутрипузырно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции.
58. Способ по любому из пп. 55-57, где ADC вводят внутрипузырно один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы.
59. Способ по любому из пп. 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 125 мг, с объемом инстиляции, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

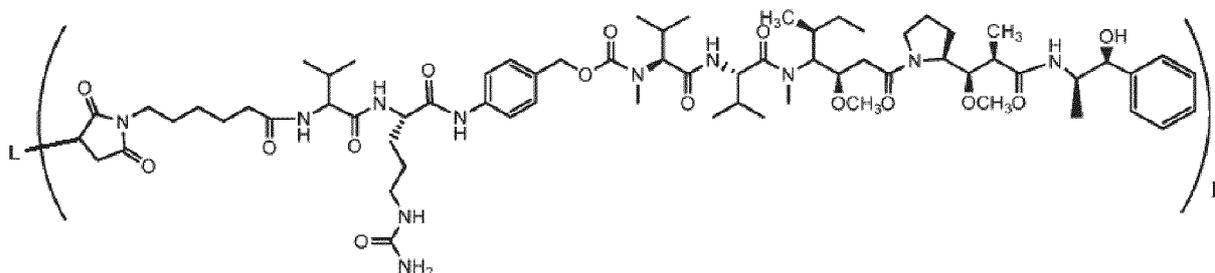
60. Способ по любому из пп. 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей

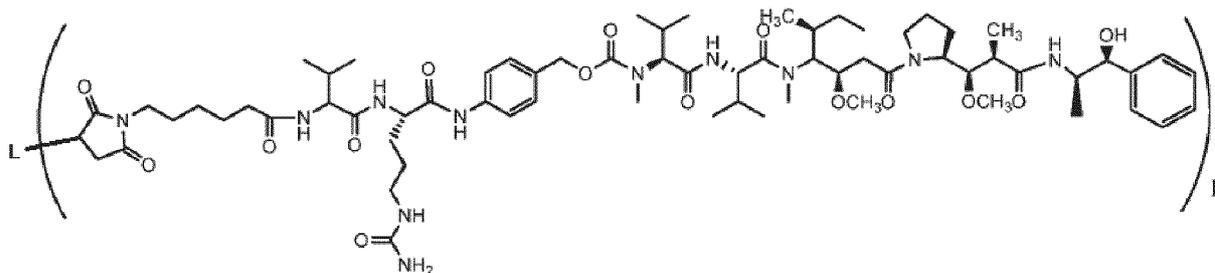
приблизительно 250 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

61. Способ по любому из пп. 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 500 мг, с объемом инстилляций, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

62. Способ по любому из пп. 1-58, где ADC характеризуется следующей структурой:



где L- представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а p равно от приблизительно 3 до приблизительно 4, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовой кислоты) до 466-й аминокислоты (лизина) последовательности под SEQ ID NO:7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновой кислоты) до 236-й аминокислоты (цистеина) последовательности под SEQ ID NO:8, где ADC вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 750 мг, с объемом инстилляцией, составляющим приблизительно 25 мл, и максимальным временем пребывания в организме 90 минут, где дозу вводят внутривенно один раз в неделю в течение шести недель во время фазы индукции и один раз в месяц в течение девяти месяцев во время фазы поддержания дозы, и где фаза поддержания дозы начинается в период от шести до десяти недель после фазы индукции.

Фиг. 1А. кДНК (SEQ ID NO:1) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:2) 191P4D12. Начальный метионин подчеркнут. Открытая рамка считывания продолжается в диапазоне нуклеиновой кислоты 264-1796, включая СТОП-КОДОН.

```
1  ggccgtcgtttgttggccacagcgtgggaagcagctctgggggagctcggagctcccgatc
61  acggcttcttggggtagctacggctgggtgtgtagaacggggcggggctggggctggg
121 tcccctagtgagaccaagtgcgagaggcaagaactctgcagcttcctgccttctgggt
181 cagttccttattcaagtctgcagccggctcccagggagatctcggtggaacttcagaaac
1      M P L S L G A E M W G P E
241 gctgggcagctctgcctttcaaccATGCCCCCTGTCCCTGGGAGCCGAGATGTGGGGCCCTG
14   A W L L L L L L A S F T G R C P A G E
301 AGGCCTGGCTGCTGCTGCTACTGCTGGCATCATTTACAGGCCGGTGCCCCGCGGGTG
34   L E T S D V V T V V L G Q D A K L P C F
361 AGCTGGAGACCTCAGACGTGTAAGTGTGGTGGTGGGCCAGGACGCAAACTGCCCTGCT
54   Y R G D S G E Q V G Q V A W A R V D A G
421 TCTACCGAGGGGACTCCGGCGAGCAAGTGGGGCAAGTGGCATGGGCTCGGGTGGACGCGG
74   E G A Q E L A L L H S K Y G L H V S P A
481 GCGAAGGCGCCCAGGAAGTACTGCACTCCAAATACGGGCTTCATGTGAGCCCCGG
94   Y E G R V E Q P P P P R N P L D G S V L
541 CTTACGAGGGCCCGTGGAGCAGCCGCCGCCACGCAACCCCTGGACGGCTCAGTGC
114  L R N A V Q A D E G E Y E C R V S T F P
601 TCCTGCGCAACGCAGTGCAGGCGGATGAGGGCGAGTACGAGTGCCGGGTGAGCACCTTCC
134  A G S F Q A R L R L R V L V P P L P S L
661 CCGCCGGCAGCTCCAGGCGCGGCTGCGGCTCCGAGTGTGGTGCCTCCCCTGCCCTCAC
154  N P G P A L E E G Q G L T L A A S C T A
721 TGAATCCTGGTCCAGCACTAGAAGAGGGCCAGGGCCTGACCCTGGCAGCCTCCTGCACAG
174  E G S P A P S V T W D T E V K G T T S S
781 CTGAGGGCAGCCCAGCCCCAGCGTGACCTGGGACACGGAGGTCAAAGGCACAACGTCCA
194  R S F K H S R S A A V T S E F H L V P S
841 GCCGTTCCCTCAAGCACTCCCGCTCTGCTGCCGTGACCTCAGAGTTCACCTTGGTGCCTA
214  R S M N G Q P L T C V V S H P G L L Q D
901 GCCGCAGCATGAATGGGCAGCCACTGACTTGTGTGGTGTCCCATCCTGGCCTGCTCCAGG
234  Q R I T H I L H V S F L A E A S V R G L
961 ACCAAAGGATCACCCACATCCTCCACGTGTCTCCTTCTGCTGAGGCCTCTGTGAGGGGCC
254  E D Q N L W H I G R E G A M L K C L S E
1021 TTGAAGACCAAAATCTGTGGCACATTGGCAGAGAAGGAGCTATGCTCAAGTGCCTGAGTG
274  G Q P P P S Y N W T R L D G P L P S G V
1081 AAGGGCAGCCCCCTCCCTCATACAAGTGGACACGGCTGGATGGGCCTCTGCCAGTGGGG
294  R V D G D T L G F P P L T T E H S G I Y
1141 TACGAGTGGATGGGGACACTTTGGGCTTTCCCCACTGACCACTGAGCACAGCGGCATCT
314  V C H V S N E F S S R D S Q V T V D V L
1201 ACGTCTGCCATGTCAGCAATGAGTTCTCCTCAAGGGATTCTCAGGTCACTGTGGATGTTT
334  D P Q E D S G K Q V D L V S A S V V V V
```


Фиг. 1В. κДНК (SEQ ID NO:3) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:4) тяжелой цепи Na22-2(2,4)6.1. Двойным подчеркиванием выделена лидерная последовательность, подчеркиванием выделен вариабельный участок тяжелой цепи, а пунктирной линией выделен человеческий константный участок IgG1.

1 GGTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATGGAGTTGGGGCTGTGGTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGA
· G V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
76 AGGTGTCCAGTGTGAGSTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCOCCTGAGACTCTC
· C A A S G F T F S S Y N M N W V R Q A P G K G L E
151 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA
· W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S
226 GTGGGTTTTCATACATTAGTAGTAGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTC
· R D N A K N S L S L Q M N S L R D E D T A V Y Y C
301 CAGAGCAATGCCAAGAACTCACTGTCTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
· A R A Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T K
376 TGGGAGAGCATACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGACACAGGTCACCGTCTCCCTCAGCCTCCACCAA
· G P S V F F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V
451 GGGCCATCGGCTTCCCCCTGGCACCTTCCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGGT
· K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P
526 CAAGGACTACTTCCCCAACCGGTGACGGTGTGGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCC
· A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
601 GGCTGTCTTACAGCTCTCAGACTCTACTCCCTCAGCAGCCTGGTGGCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
· T Y I C N V N H K P S N T R V D K R V E P K S C D
676 GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCGACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGA
· K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K
751 CAAAACCTCACATGCCCCACCGTGGCCAGCAGCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA
· P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P
826 ACCCAAGGACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGGGTGGTGGTGGGACGTGAGCCACGAAGACC
· E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E Q Y
901 TGACCTCAAGTTCAACTGGTACCTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGCGGAGGAGCAGTA
· N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
976 CAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCTGCAACAGGACTGGCTGAAATGGCAAGGAGTACAAAGTG
· K V S N K A L P A P A P E K T I S K A K G Q P R E P
1051 CAAGGTCTCCAACBAAGCCCTCCCGAGCCCACTCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAAC
· Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G
1126 ACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAGG
· F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T P P
1201 CTTCTATCCCGAGCAGTCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACBAGACCACGCCCTCC
· V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
1276 CGTCTGGACTCCGACGGCTCTCTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGCCACAGGGGAA
· V F S N K A M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
1351 CGTCTTCTCATGCTCCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGAGAGAGCCTCTCCCTGCCCCGGG
· K *
1426 TAAATGA

Фиг. 1С. κДНК (SEQ ID NO:5) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:6) легкой цепи Na22-2(2,4)6.1. Двойным подчеркиванием выделена лидерная последовательность, подчеркиванием выделен вариабельный участок легкой цепи, а пунктирной линией выделен человеческий константный участок каппа-цепи.

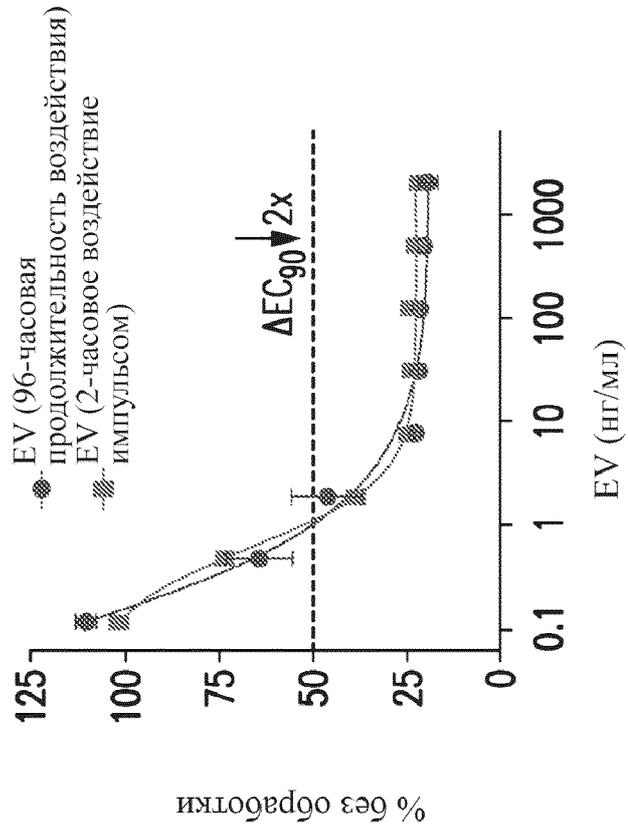
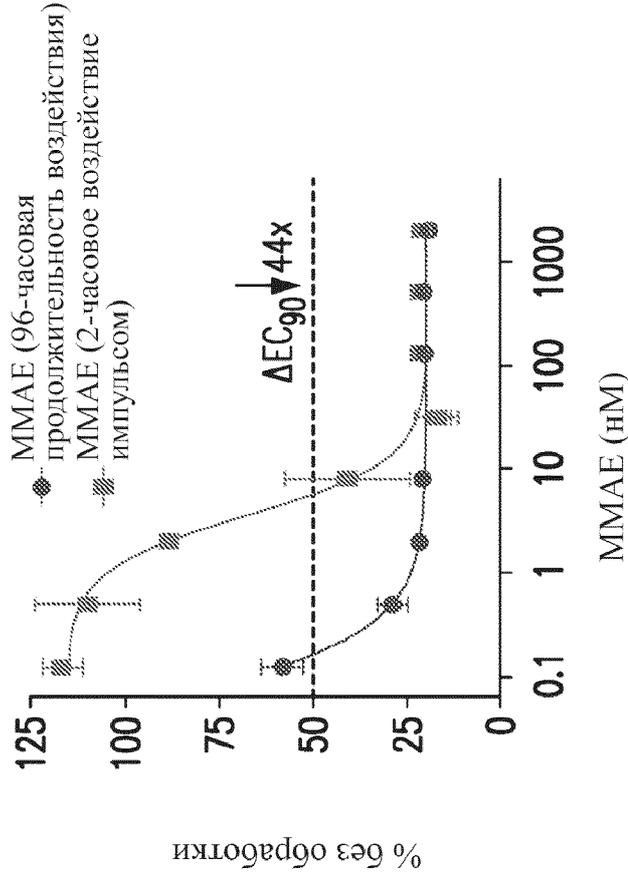
1 AGTCAGACCCAGTCAAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGTCTGGTTC
P G S R C D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T
76 CCAGGTTCCAGATGCGCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTCAACC
I T C R A S Q G I S G W L A W Y Q Q K P G K A P K
151 ATCAGTTGTCCGGCGAGTCAAGGATTTAGCGGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAG
F L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D
226 TTCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGTTCCCATCAAGGTTCAAGGCTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P
301 TTCACCTTCAACATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCT
P T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
376 CCCACTTTCCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCCCA
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K
451 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAA
V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D
526 GTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
601 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGGCGAA
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C *
676 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Фиг. 1D. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:7) тяжелой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Двойным подчеркиванием выделена лидерная последовательность, подчеркиванием выделен вариабельный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO:22, которая является последовательностью в диапазоне от 20-й до 136-й аминокислоты последовательности под SEQ ID NO:7), а пунктирной линией выделен человеческий константный участок IgG1.

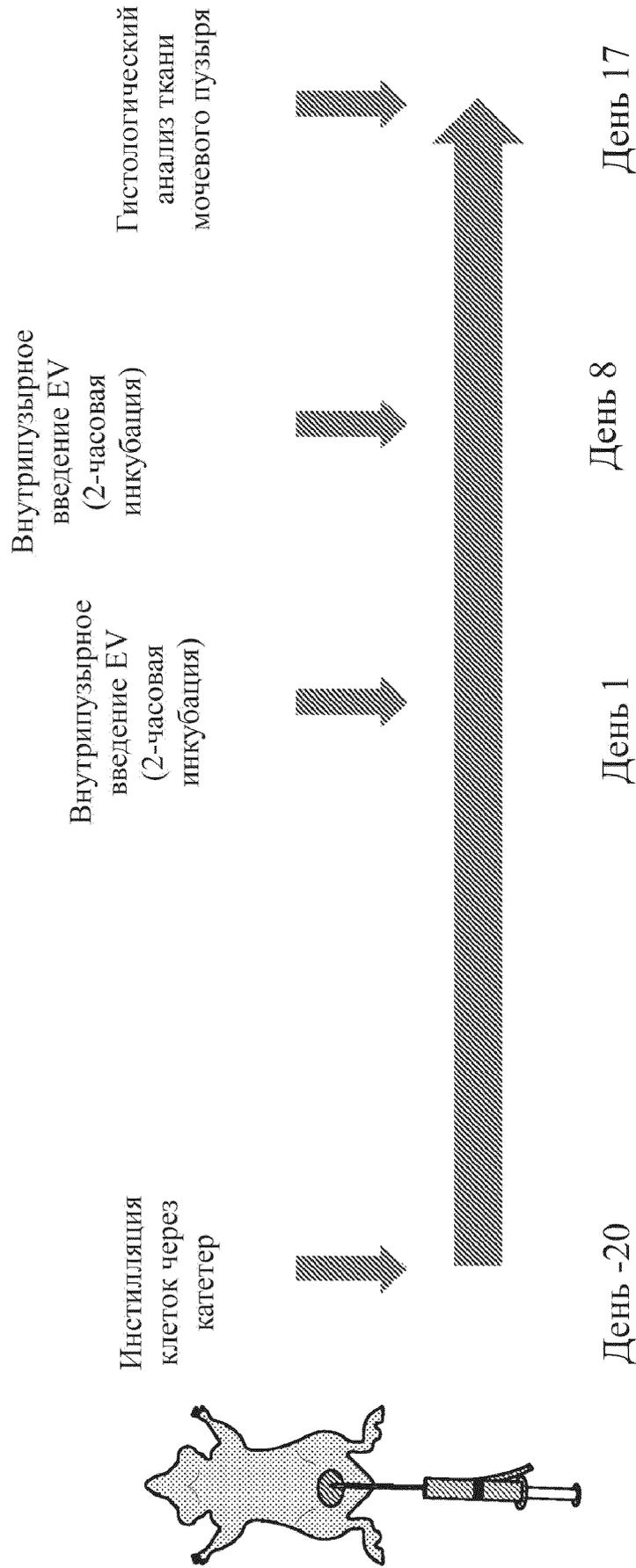
1 MELGLCWVFLVAILEGVOCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 51 YNMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSL
 101 QMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 151 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 201 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
 251 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 301 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 351 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 401 ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA
 451 LHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 1E. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:8) легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Двойным подчеркиванием выделена лидерная последовательность, подчеркиванием выделен вариабельный участок легкой цепи (SEQ ID NO:23, которая является последовательностью в диапазоне от 23-й до 130-й аминокислоты последовательности под SEQ ID NO:8), а пунктирной линией выделен человеческий константный участок каппа-цепи.

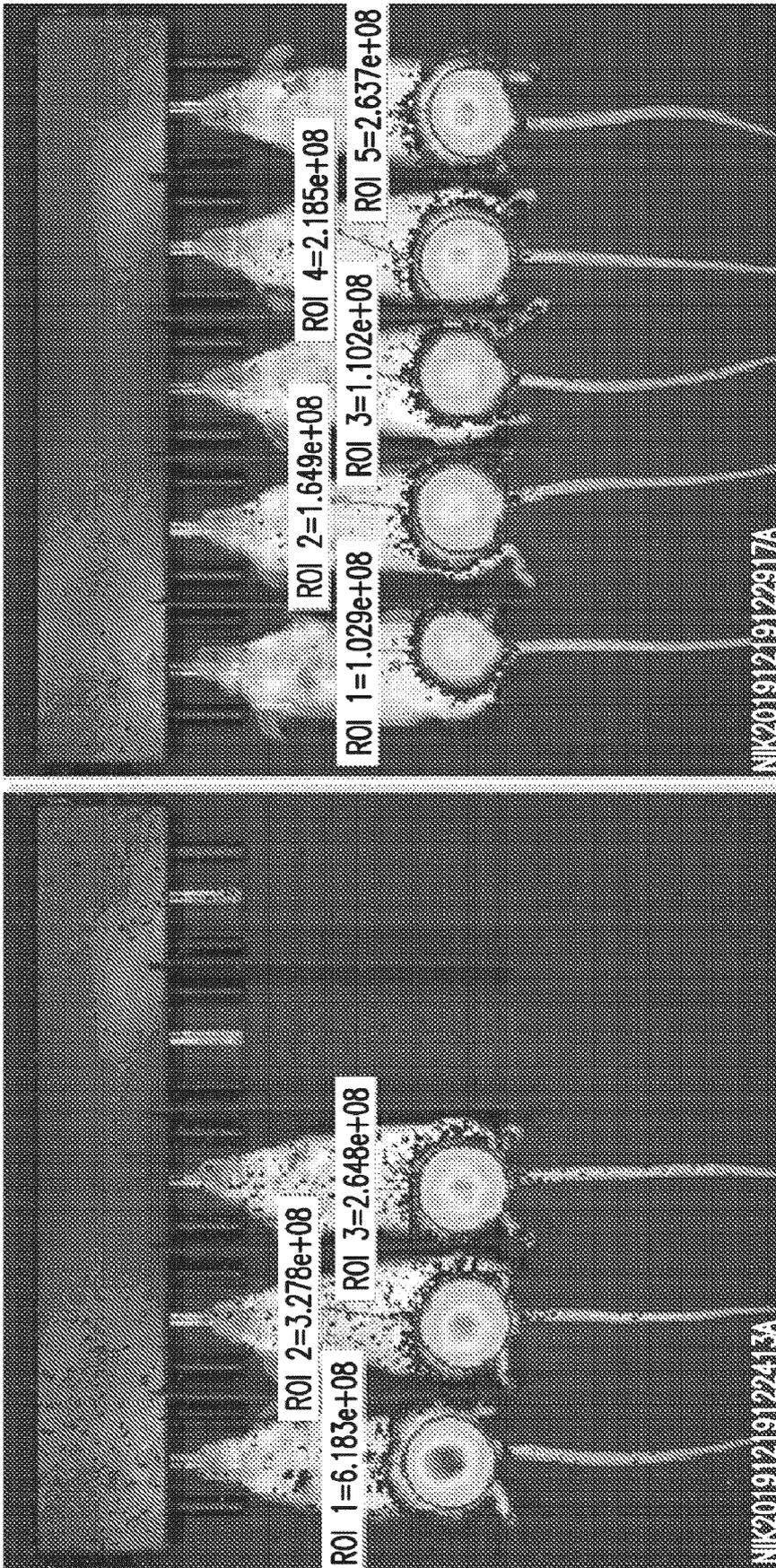
1 MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG
 51 ISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
 101 QPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 151 TASVVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
 201 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC



Фиг. 2



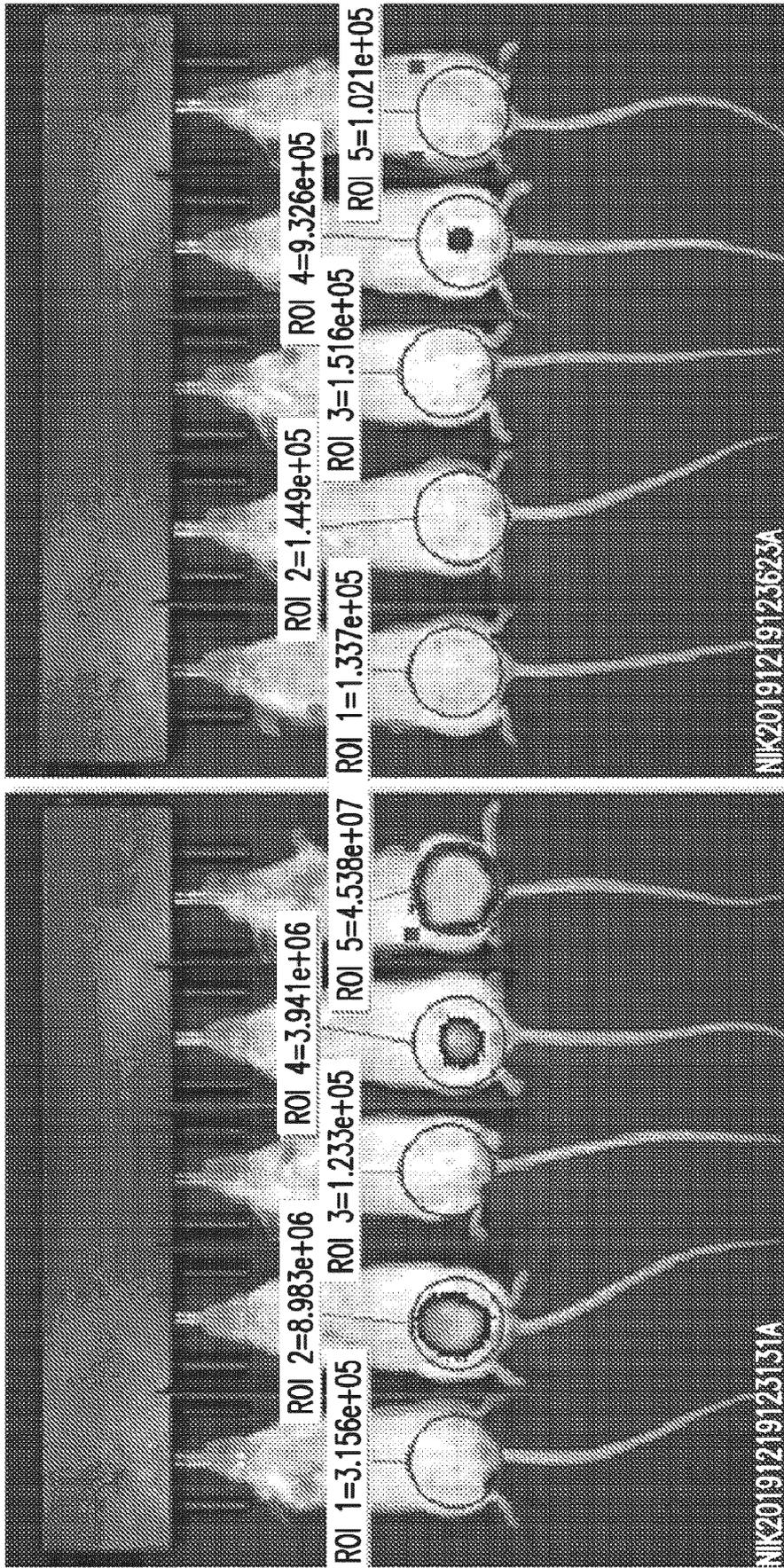
Фиг. 3А



Без обработки

Среда (SWFI)
2-часовое
внутритриггерное
введение

Фиг. 3В



EV
2-часовое
внутрипузырное
введение

EV
IV доза

Фиг. 3В (Продолжение)

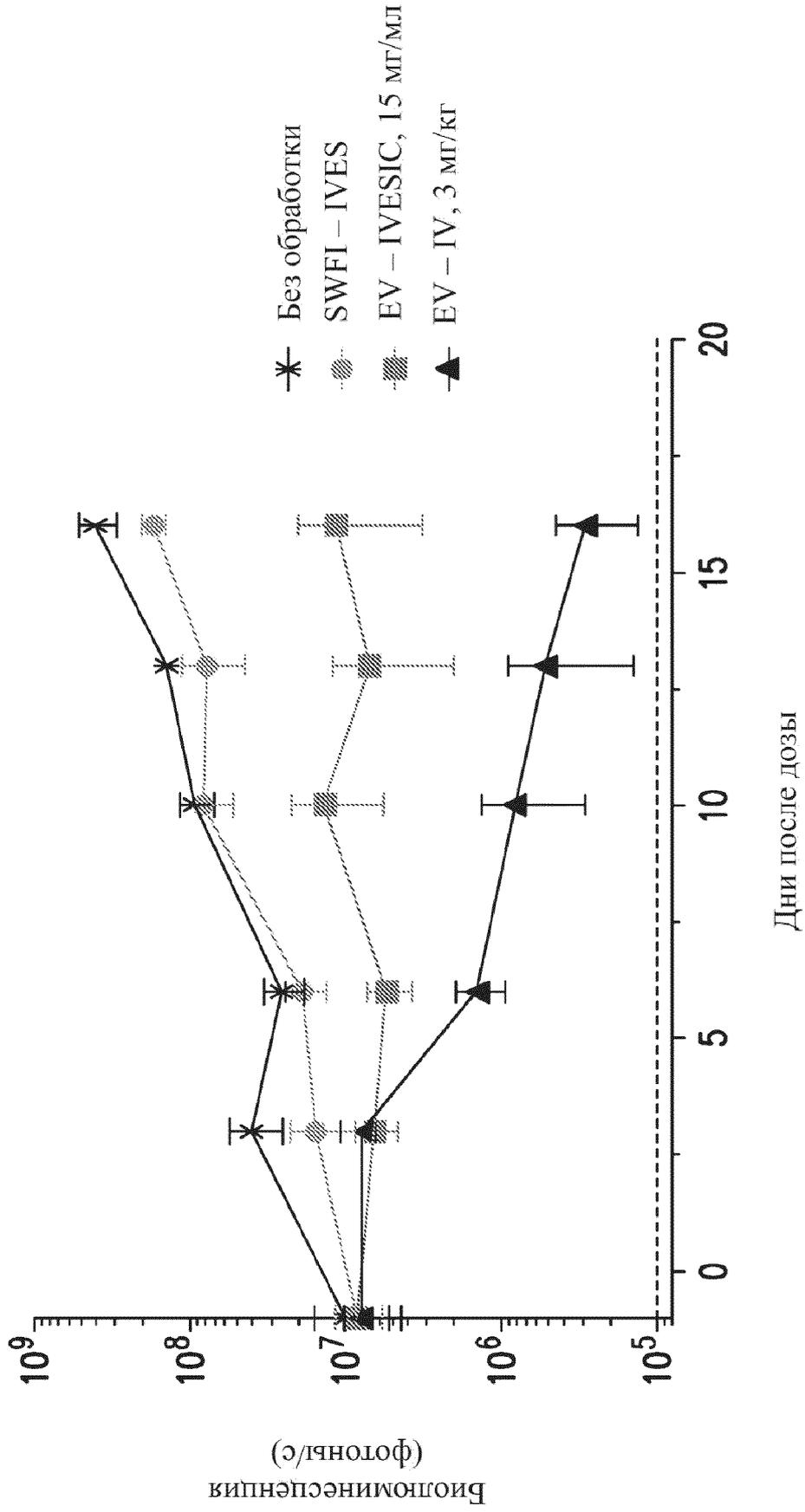


Внутрипузырный EV
(0,5 мг/см²)

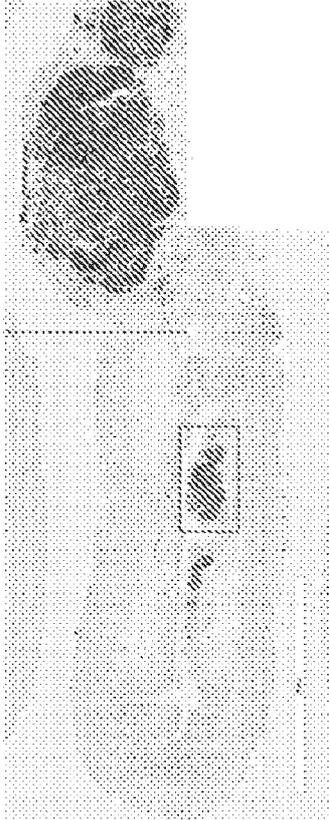
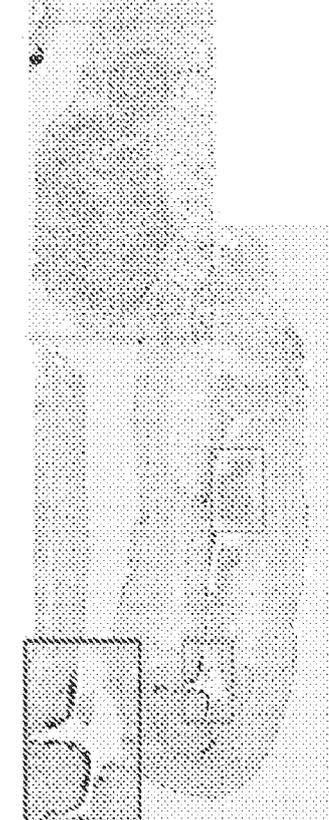
Репрезентативная
среда

Фиг. 3С

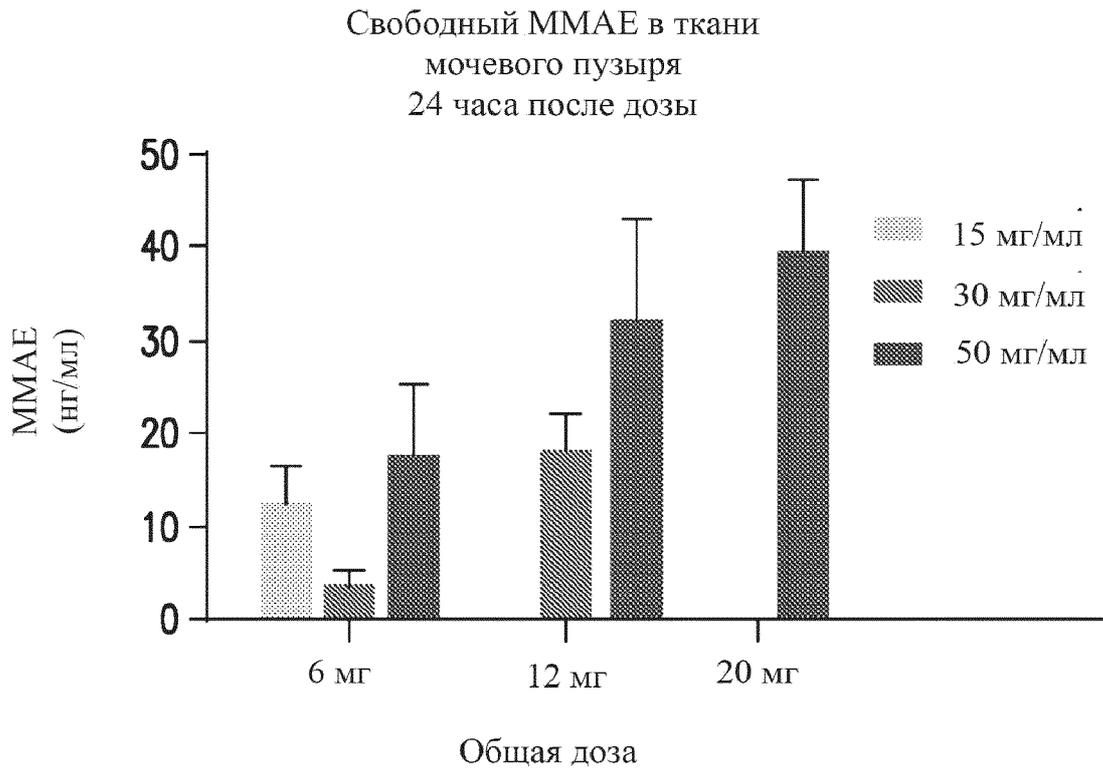
Активность EV в модели ортотопического UMUC3-Luc+
трансплантата мочевого пузыря



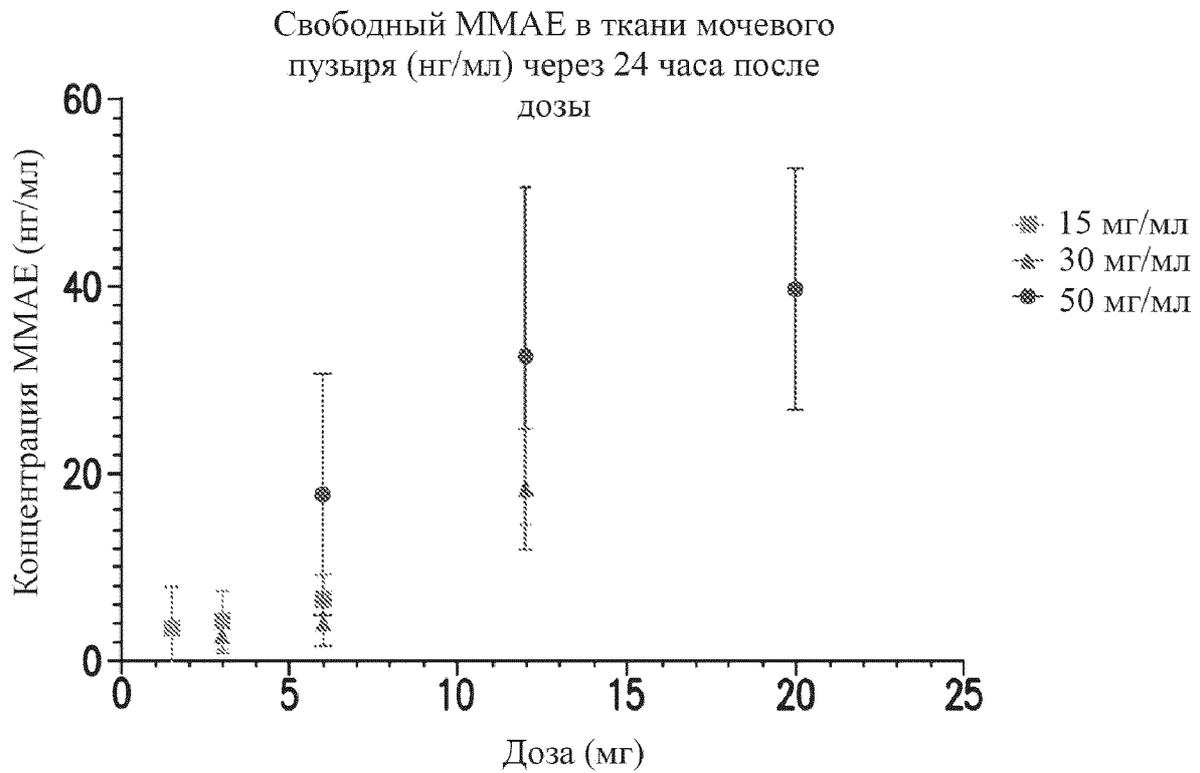
Фиг. 3D

<p>2-часовое внутривенное введение дозы Мыши, носители опухоли</p>	 <p>hNectin-4</p>	<p>2-часовое внутривенное введение дозы Интактные мыши</p>	
<p>Антитело к MMAE</p>			

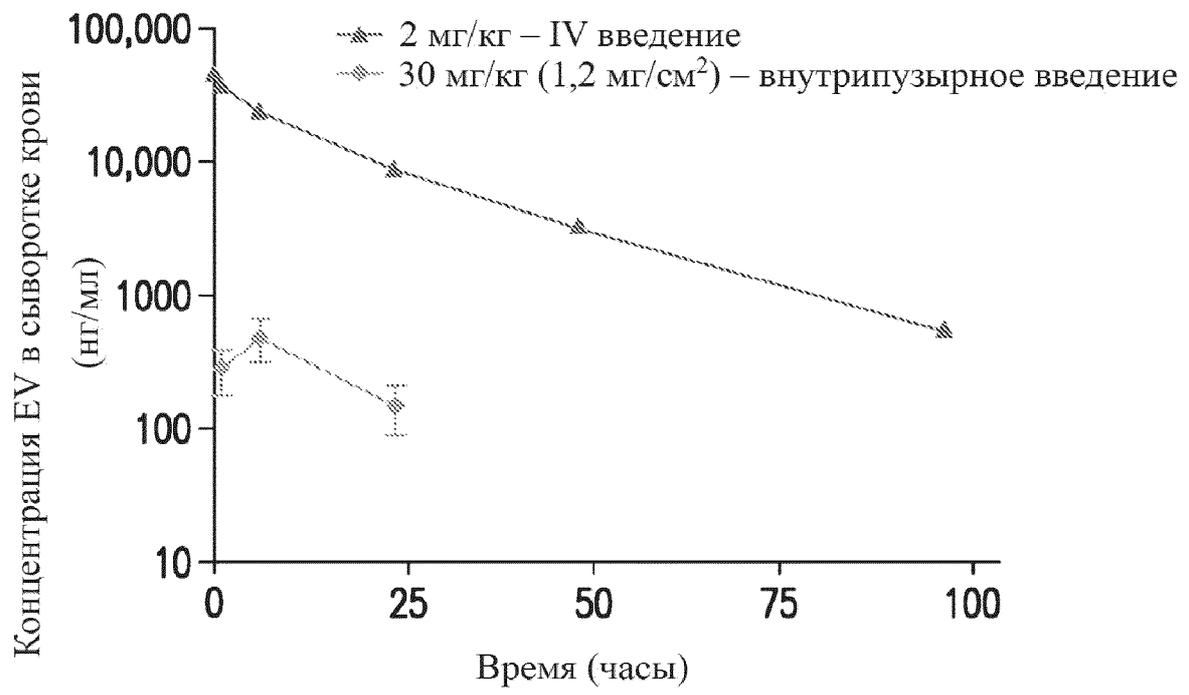
Фиг. 3E



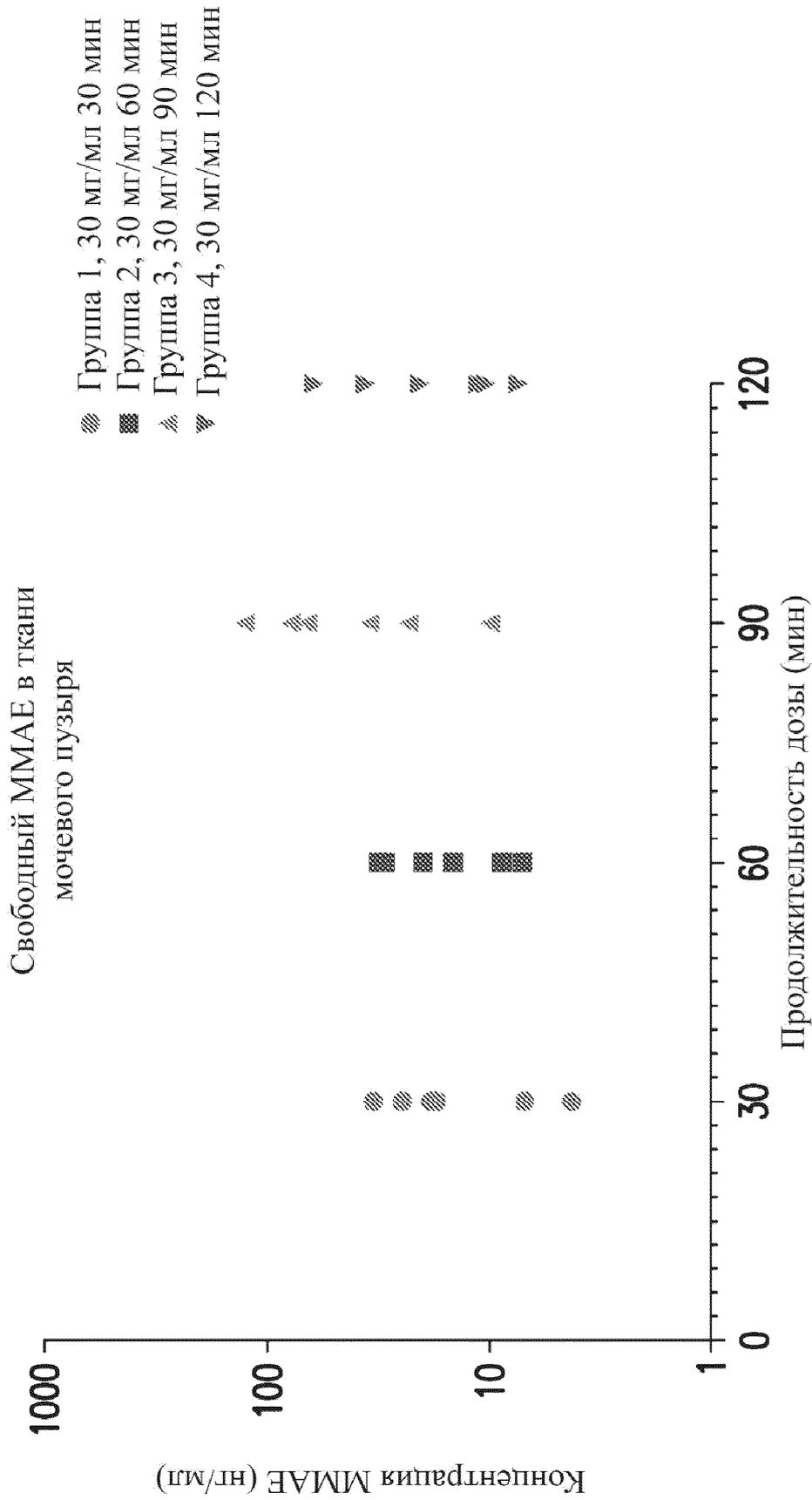
Фиг. 4А



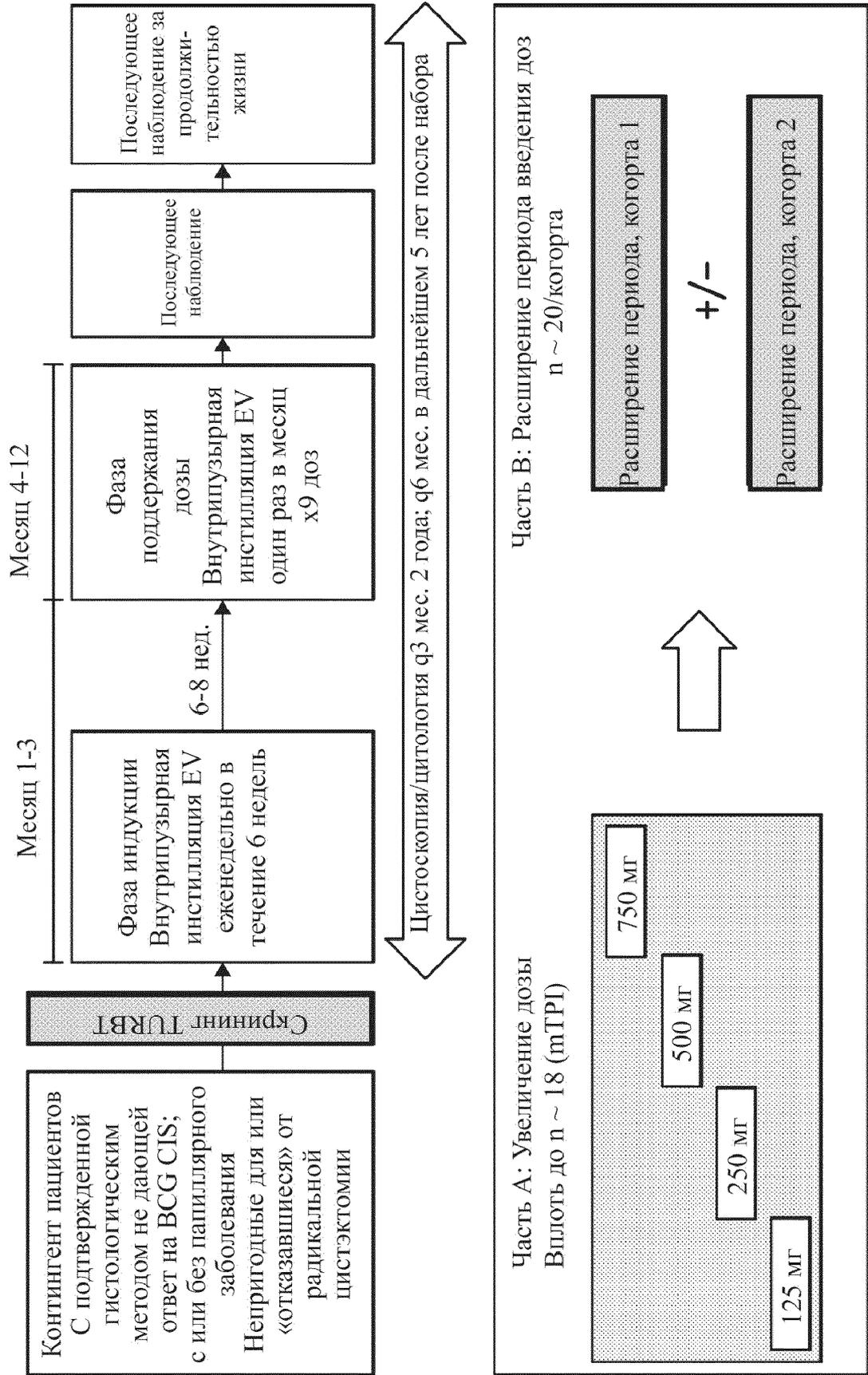
Фиг. 4В



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7