

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393575** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.05.21

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

(22) Дата подачи заявки
2022.07.21

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО ПРОТИВ TROP2-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **202110823295.2**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.07.21**

**Мо Сиелэ, Тянь Чэньминь, Лю Сюнь
(CN)**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/107134**

(74) Представитель:

(87) **WO 2023/001248 2023.01.26**

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

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

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело против TROP2-лекарственное средство, и ее применению. В частности, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство в буфере. Фармацевтическая композиция обладает хорошей стабильностью.

A1

202393575

202393575

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО ПРОТИВ TROP2 - ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Настоящее раскрытие принадлежит к области фармацевтических препаратов и, в частности, относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело против TROP2-лекарственное средство, и ее применению в качестве противоракового лекарственного средства.

10 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Утверждения, приведенные ниже в данном документе, предоставляют только общую информацию, связанную с настоящим раскрытием, и необязательно составляют предшествующий уровень техники.

15 Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC - от англ. Antibody drug conjugate) связывает моноклональное антитело или фрагмент антитела с биологически активным цитотоксином посредством стабильного химического линкерного соединения, с полным использованием специфичности связывания антитела с поверхностными антигенами опухолевых клеток и высокой эффективностью цитокина, и также избегая недостатка первого, заключающегося в 20 плохом терапевтическом эффекте, недостатка последнего, заключающегося в серьезных токсичных побочных эффектах и т.п. Это означает, что конъюгат антитело – лекарственное средство может более точно связываться с опухолевыми клетками и оказывает уменьшенное воздействие на нормальные клетки, по сравнению с общепринятыми химиотерапевтическими лекарственными средствами 25 предыдущих лет (Mullard A, (2013) *Nature Reviews Drug Discovery*, 12:329-332; DiJoseph JF, Armellino DC, (2004) *Blood*, 103:1807-1814).

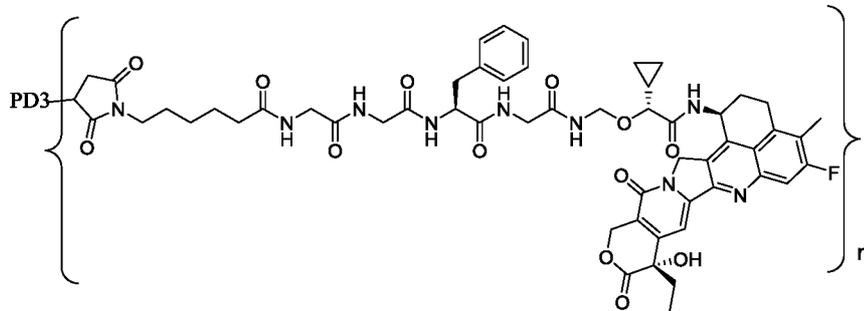
30 Существует несколько классов малых молекул с цитотоксичностью для конъюгатов антитело–лекарственное средство, один из которых представляет собой производные камптотецина, оказывающие противоопухолевое действие за счет ингибирования топоизомеразы I. Сообщали о производном камптотецина, иринотекане (химическое название: (1S, 9S)-1-амино-9-этил-5-фтор-2,3-дигидро-9-гидрокси-4-метил-1*H*,12*H*-бензо[де]пирано[3',4':6,7]имидазо[1,2-*b*]хинолин- 10,13(9*H*,15*H*)-дион), для применения в конъюгатах антитело - лекарственное средство (ADC), как описано в WO2014057687; *Clinical Cancer Research* (2016)22 35 (20):5097-5108; *Cancer Sci* (2016) 107: 1039-1046. Все еще существует

необходимость в дальнейшей разработке ADC-лекарственных средств, обладающих улучшенным терапевтическим эффектом.

Однако, ADC принадлежат к более сложным гетероструктурам, чем антитела, и, вследствие этого, большой вызов брошен ADC-препаратам в терапевтических целях.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство и буфер, где данный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, показанную ниже:



Конъюгат антитело – лекарственное средство, описанный выше, получают в соответствии с ADC-1 Примером 3-1 (пример конъюгатов антитела) на странице 41 описания PCT/CN2021/073279;

где:

PD3 представляет собой антитело против TROP2, полученное в соответствии с антителом PD3 на странице 41 PCT/CN2021/073279, которое содержит тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 13 в PCT/CN2021/073279), и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 14 в PCT/CN2021/073279):

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи PD3:

EVQLVQSGSELKKGASVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGPEPT
 YTDYFKGRFAFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLTQVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
 LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 1;

Аминокислотная последовательность легкой цепи PD3:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDR
 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 5 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTL
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2;

10 n равен 1 - 10, предпочтительно 1 - 8, более предпочтительно 3 - 5 и наиболее предпочтительно примерно 4; буфер фармацевтической композиции представляет собой буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина с рН от примерно 5,0 до примерно 6,5, предпочтительно рН от примерно 5,5 до примерно 6,5, и более предпочтительно рН от примерно 5,9 до примерно 6,2.

15 В альтернативном воплощении буфер в фармацевтической композиции имеет рН от примерно 5,0 до примерно 6,5, и неограничивающие примеры включают примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3, примерно 5,4, примерно 5,5, примерно 5,6, примерно 5,7, примерно 5,8, примерно 5,9, примерно 6,0, примерно 6,1, примерно 6,2, примерно 6,3, примерно 6,4, примерно 6,5, и любой интервал между ними; рН предпочтительно представляет собой от примерно 5,5 до примерно 6,5 и более предпочтительно от примерно 5,9 до примерно 6,2.

20 В альтернативном воплощении буфер в фармацевтической композиции находится в концентрации от примерно 5 мМ до примерно 50 мМ, и неограничивающие примеры включают 10 мМ, 12 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, и любой интервал между ними; буфер предпочтительно находится в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ, более предпочтительно от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ, и наиболее предпочтительно примерно 30 мМ.

30 В альтернативном воплощении фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата, полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера, Тритона, додецилсульфоната натрия, лаурилсульфоната натрия, октилгликозида натрия, лаурилсульфобетаина, миристил-сульфобетаина, линолеил-сульфобетаина, стеарил-сульфобетаина, лаурил-саркозина, миристил-саркозина, линолеил-саркозина, стеарил-саркозина, линолеил-бетаина, миристил-бетаина, цетил-бетаина, лаурамидопропил-бетаина, 35 кокарамидпропил-бетаина, линолеинамидпропил-бетаина, миристиламидпропил-

бетаина, пальмитамидпропил-бетаина, изостеарамидпропил-бетаина, миристиламидпропил-диметиламина, пальмитамидпропил-диметиламина, изостеарамидпропил-диметиламина, метилкокоила натрия, метилолеилтаурата натрия, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этилена и пропиленгликоля и тому подобное. Поверхностно-активное вещество предпочтительно представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20 и более предпочтительно полисорбат 80.

В альтернативном воплощении поверхностно-активное вещество в фармацевтической композиции находится в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,05 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл, более предпочтительно от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл или от примерно 0,2 мг/мл до примерно 0,6 мг/мл, и наиболее предпочтительно примерно 0,2 мг/мл, и неограничивающие примеры включают примерно 0,02 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,35 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,45 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл и любой интервал между ними.

В альтернативном воплощении упомянутая выше фармацевтическая композиция дополнительно содержит сахарид. Термин «сахарид» по настоящему раскрытию включает общий состав $(\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O})_n$ и его производные, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахарные спирты, восстанавливающие сахара, невосстанавливающие сахара и т.д. Сахарид может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, фруктозы, мальтозы, декстрана, глицерина, эритрита, глицерина, арабита, силита, сорбита, маннита, меллибиозы, мелецитозы, раффинозы, маннотриозы, стахиозы, мальтозы, лактулозы, мальтулозы, глюцита, мальтита, лактита, изомальтулозы и т.д. Сахарид предпочтительно представляет собой невосстанавливающий дисахарид, более предпочтительно выбран из группы, состоящей из дигидрата трегалозы и сахарозы, и наиболее предпочтительно представляет собой сахарозу.

В альтернативном воплощении сахарид в указанных фармацевтической композиции находится в концентрации от примерно 25 мг/мл до примерно 80 мг/мл и предпочтительно от примерно 30 мг/мл до примерно 50 мг/мл, и неограничивающие примеры включают 25 мг/мл, 30 мг/мл, 35 мг/мл, 40 мг/мл, 45 мг/мл, 50 мг/мл, 55 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл и любой интервал между ними; сахарид предпочтительно находится в концентрации 40 мг/мл.

В альтернативном воплощении упомянутая выше фармацевтическая композиция дополнительно содержит аминокислоту и ее соль, и данная аминокислота или ее соль предпочтительно выбрана из группы, состоящей из

глицина и гидрохлорида аргинина, и более предпочтительно представляет собой глицин.

В альтернативном воплощении глицин в указанных фармацевтической композиции находится в концентрации от примерно 6 мг/мл до примерно 15 мг/мл, от примерно 7 мг/мл до примерно 11 мг/мл, предпочтительно от примерно 7 мг/мл до примерно 10 мг/мл и более предпочтительно от примерно 7 мг/мл до примерно 9 мг/мл или от примерно 8 мг/мл до примерно 9 мг/мл, и неограничивающие примеры включают примерно 6 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7 мг/мл, 7,2 мг/мл, 7,6 мг/мл, 7,8 мг/мл, 8 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 10,2 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл и любой интервал между ними; глицин наиболее предпочтительно находится в концентрации примерно 9 мг/мл.

В альтернативном воплощении конъюгат антитело-лекарственное средство в фармацевтической композиции имеет концентрацию белка от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл, и неограничивающие примеры включают 1 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл, 16 мг/мл, 17 мг/мл, 18 мг/мл, 19 мг/мл, 20 мг/мл, 21 мг/мл, 22 мг/мл, 23 мг/мл, 24 мг/мл, 25 мг/мл, 26 мг/мл, 27 мг/мл, 28 мг/мл, 29 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл и любой интервал между ними; конъюгат антитело-лекарственное средство предпочтительно находится в концентрации белка от примерно 10 мг/мл до примерно 30 мг/мл, более предпочтительно от примерно 18 мг/мл до примерно 22 мг/мл, и наиболее предпочтительно примерно 20 мг/мл. В частности, неограничивающие примеры включают 20,1 мг/мл, 20,2 мг/мл, 20,3 мг/мл, 20,4 мг/мл, 20,5 мг/мл, 20,6 мг/мл, 20,7 мг/мл, 20,8 мг/мл, 20,81 мг/мл, 20,82 мг/мл, 20,83 мг/мл, 20,84 мг/мл, 20,85 мг/мл, 20,86 мг/мл, 20,87 мг/мл, 20,88 мг/мл, 20,89 мг/мл, 20,9 мг/мл, 20,9 мг/мл, 20,91 мг/мл, 20,92 мг/мл, 20,93 мг/мл, 20,94 мг/мл, 20,95 мг/мл, 20,96 мг/мл, 20,97 мг/мл, 20,98 мг/мл, 20,99 мг/мл, 21 мг/мл и любой интервал между ними. Концентрация белка относится к концентрации группировки антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство. В альтернативном воплощении интервал загрузки лекарственным средством (n) может представлять собой среднее число связанных цитотоксических лекарственных средств на антитело против Trop2, и неограничивающие примеры включают среднее число связанных цитотоксических лекарственных средств на антитело, примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, и любой интервал между ними. Предпочтительно, загрузка лекарственным средством выбрана из группы, состоящей из 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 3-4, 3-5, 5-6, 5-7, 5-8 и 6-8. Для иллюстрации, загрузка лекарственным средством может представлять собой

среднее число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. n представляет собой десятичное число или целое число.

В альтернативном воплощении загрузка лекарственным средством (n) равна примерно 4.

5 В альтернативном воплощении фармацевтическая композиция содержит:

(a) конъюгат антитело - лекарственное средство с концентрацией белка от примерно 10 мг/мл до примерно 30 мг/мл, (b) от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл полисорбата, (c) от примерно 30 мг/мл до примерно 50 мг/мл сахара, (d) от примерно 7 мг/мл до примерно 11 мг/мл глицина и (e) от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, причем композиция имеет рН примерно 5,5-6,5;

Предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит следующие компоненты:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации белка от примерно 18 мг/мл до примерно 22 мг/мл, (b) примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 40 мг/мл сахарозы, (d) примерно 9 мг/мл глицина и (e) примерно 30 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, причем композиция имеет рН примерно 5,9-6,2;

более предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит следующие компоненты:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации белка примерно 20 мг/мл, (b) примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 40 мг/мл сахарозы, (d) примерно 9 мг/мл глицина и (e) примерно 30 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, причем композиция имеет рН примерно 6,0.

25 В альтернативном воплощении фармацевтическая композиция по любому из упомянутых выше воплощений представляет собой жидкий препарат. Жидкий препарат или восстановленный препарат по настоящему изобретению обладает относительно хорошей стабильностью и может храниться при температуре охлаждения (4°C) в течение по меньшей мере 3 месяцев. Кроме того, стабильные жидкие препараты включают жидкие препараты, которые демонстрируют желательные признаки после хранения при температурах, включая 25°C, на протяжении периодов, включающих 1 месяц, 2 месяца и 3 месяца. Кроме того, стабильные жидкие препараты включают жидкие препараты, которые демонстрируют желательные признаки после хранения при температурах, включая 30 40°C, на протяжении 1 месяца.

Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложен лиофилизированный препарат, содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство, где данный препарат может быть восстановлен с образованием фармацевтической композиции, описанной выше.

5 Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ получения лиофилизированного препарата, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство, который включает стадию лиофилизации фармацевтической композиции, описанной выше.

10 В альтернативном воплощении лиофилизация в способе получения лиофилизированного препарата, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство, включает последовательные стадии предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки. Лиофилизацию проводят посредством заморозки препарата и последующей сублимации воды при температуре, подходящей для первичной сушки. В данных условиях продукт находится при
15 температуре, ниже чем эвтектическая точка или температура разрушения препарата. Обычно, температура первичной сушки находится в интервале от примерно -30°C до 25°C (при том условии, что продукт остается замороженным на протяжении первичной сушки). Состав, размер и тип контейнера (например, стеклянный флакон), содержащего данный образец, и объем жидкости определяют
20 время, требуемое для сушки, которое может находиться в интервале от нескольких часов до нескольких суток (например, 40-60 часов). Вторичную сушку можно проводить при примерно $0-40^{\circ}\text{C}$, что главным образом зависит от типа и размера контейнера и типа используемого белка. Время, необходимое для вторичной сушки, определяется желательным содержанием остаточной влаги в продукте, и оно
25 обычно занимает по меньшей мере примерно 5 часов. Обычно, содержание воды препарата, лиофилизированного при низком давлении, меньше чем примерно 5%, предпочтительно меньше чем примерно 3%. Давление может быть таким же, как давление, применяемое на стадии первичной сушки; предпочтительно, давление вторичной сушки ниже, чем давление первичной сушки. Условия лиофилизации
30 могут варьировать в зависимости от состава и размера флакона.

В альтернативном воплощении настоящего раскрытия 4,4 мл маточного раствора композиции лиофилизируют, и способ лиофилизации выглядит следующим образом: предварительное замораживание при температурах 5°C и -45°C , последовательно; первичная сушка при температуре -20°C и при степени
35 вакуума 10 Па; и вторичная сушка при температуре 25°C и при степенях вакуума 10 Па и 1 Па, последовательно.

В некоторых воплощениях лиофилизированный препарат является стабильным при 2-8°C в течение по меньшей мере 16 суток, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых воплощениях лиофилизированный препарат стабилен при 40°C в течение по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 14 суток, по меньшей мере 28 суток или по меньшей мере 30 суток.

Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложен лиофилизированный препарат, содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство, полученный посредством лиофилизации фармацевтической композиции конъюгата антитело-лекарственное средство, описанной выше.

Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложен восстановленный раствор, содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство, где восстановленный раствор получен посредством восстановления лиофилизированного препарата, описанного выше.

Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложен способ получения восстановленного раствора, описанный выше, который включает стадию восстановления упомянутого выше лиофилизированного препарата раствором, выбранным из группы, состоящей из воды для инъекции, нормального физиологического раствора и раствора глюкозы, но, не ограничивающейся ими.

В альтернативном воплощении восстановленный раствор содержит следующие компоненты:

(a) от примерно 10 мг/мл до примерно 30 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство, (b) от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл полисорбата, (c) от примерно 25 мг/мл до примерно 80 мг/мл сахарозы, (d) от примерно 7 мг/мл до примерно 11 мг/мл глицина, и (e) от примерно 10 мМ до примерно 40 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, причем композиция имеет рН примерно 5,5-6,5; предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит следующие компоненты:

(a) от примерно 18 мг/мл до примерно 22 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство, (b) примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 40 мг/мл сахарозы, (d) примерно 9 мг/мл глицина, и (e) примерно 30 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, причем композиция имеет рН примерно 5,9-6,2;

более предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит следующие компоненты:

(a) примерно 20 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство, (b) примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 40 мг/мл сахарозы, (d) примерно 9 мг/мл глицина, и (e) примерно 30 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, причем композиция имеет рН примерно 6,0.

5 Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложено изделие, содержащее контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, лиофилизированный препарат или восстановленный раствор, описанный выше. В некоторых воплощениях контейнер представляет собой трубчатый флакон для инъекций, сделанный из нейтрального боросиликатного стекла.

10 Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложено применение указанных фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата, восстановленного раствора или изделия для получения лекарственного средства для лечения или предупреждения опухоли.

15 Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложен способ лечения заболевания, включающий предоставление указанных фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата, восстановленного раствора или изделия.

20 Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложено применение указанных фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата, восстановленного раствора или изделия в качестве лекарственного средства в лечении заболевания.

25 Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложены вышеуказанные фармацевтическая композиция, лиофилизированный препарат, восстановленный раствор или изделие в качестве лекарственного средства, которые предпочтительно используют для лечения или предупреждения опухолевого заболевания.

В альтернативном воплощении заболевание или опухоль представляет собой TROP2-опосредованное заболевание или состояние.

30 Кроме того, согласно настоящему раскрытию предложено применение указанных фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата, восстановленного раствора или изделия в качестве лекарственного средства для получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения опухоли и рака, где данная опухоль и рак предпочтительно представляют собой плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак головы и шеи, рак головного мозга, 35 нейроглиому, мультиформную глиобластому, нейробластому, карциному центральной нервной системы, нейроэндокринную опухоль, рак горла,

фарингеальную плоскоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному ротовой полости, назофарингеальный рак, рак пищевода, рак щитовидной железы, злокачественную мезотелиому плевры, рак легкого, рак молочной железы, рак печени, рак гепатобилиарной системы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак

5 желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак почки, светлоклеточную карциному почки, рак яичника, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак яичка, рак кожи, меланому, лейкоз, лимфому, рак кости, хондросаркому, миелому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, опухоль

10 Крукенберга, миелопролиферативную опухоль, плоскоклеточную карциному, саркому Юинга, уротелиальную карциному и клеточную карциному Меркеля; более предпочтительно, лимфома выбрана из группы, состоящей из лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, первичной медиастинальной В-крупноклеточной

15 лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, Т-клеточной/богатой гистиоцитами крупноклеточной В-клеточной лимфомы и лимфоплазмочитарной лимфомы; рак легкого выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого; лейкоз выбран из группы, состоящей из хронического миелоидного лейкоза, остро

20 миелоидного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лимфобластного лейкоза, остро лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза и миелоидного лейкоза.

Как хорошо известно специалистам в данной области, один, некоторое количество или все признаки разных воплощений, описанных в настоящем

25 изобретении, могут быть дополнительно объединены с образованием других воплощений настоящего раскрытия. Упомянутые выше воплощения настоящего раскрытия и другие воплощения, полученные в результате объединения, дополнительно проиллюстрированы посредством следующего подробного

30

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, которая способствует получению и введению и является стабильной в отношении свойств. Нежелательная нестабильность может включать любое одно

35 или более из нижеследующего: агрегирование, дезамидирование (например, дезамидирование Asn), окисление (например, Met-окисление), изомеризация

(например, Asp изомеризация), отсечение/гидролиз/фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимиды, непарных цистеинов, диссоциация токсинов и т.п. В частности, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем изобретении, содержит конъюгат антитело - лекарственное средство и буфер.

Терминология

Для облегчения понимания настоящего раскрытия некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если где-либо в данном документе явным образом не определено иное, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно подразумеваемые обычными специалистами в области, к которой принадлежит настоящее раскрытие. Содержание заявки WO2020063673 включено в данный документ посредством ссылки в своей полноте.

Термин «конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)» означает, что антитело связано линкерным звеном с биологически активным цитотоксином или низкомолекулярным лекарственным средством, обладающим активностью в отношении уничтожения клеток. Фраза «загрузка лекарственным средством», также называемая отношением лекарственного средства к антителу (DAR – от англ. drug-to-antibody ratio), относится к среднему числу лекарственных средств, конъюгированных с каждым антителом в ADC. Оно может находиться в интервале, например, от примерно 1 до примерно 10 лекарственных средств, конъюгированных с каждым антителом, и в некоторых воплощениях, от примерно 1 до примерно 8 лекарственных средств, конъюгированных с каждым антителом, предпочтительно выбрано из группы, состоящей из 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 3-4, 3-5, 5-6, 5-7, 5-8 и 6-8 лекарственных средств, конъюгированных с каждым антителом. Для иллюстрации, загрузка лекарственным средством может представлять собой среднее число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. Общие формулы ADC по настоящему раскрытию включают группу антител, конъюгированных с лекарственными средствами в пределах определенного интервала, как описано выше. В воплощениях настоящего раскрытия загрузка лекарственным средством может быть представлена как n . Загрузка лекарственным средством может быть определена традиционными способами, такими как спектроскопия в УФ- и видимой области, масс-спектрометрия, анализ ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay - твердофазный иммуноферментный анализ) и ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография).

Термин «линкерное звено» или «линкерный фрагмент» относится к фрагменту химической структуры или связи, которые связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом на одном конце и с лекарственным средством на другом конце, и также могут быть связаны с лекарственным средством после связывания с другим линкером.

Линкер включает вставочное звено, спейсерное звено и аминокислотное звено и может быть синтезирован способами, известными в данной области, такими как способы, описанные в US2005-0238649A1. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», способствующий высвобождению лекарственных средств в клетках. Например, могут быть использованы линкеры, неустойчивые в кислоте (например, гидразоны), чувствительные к протеазе линкеры (например, чувствительные к пептидазе), светочувствительные линкеры, диметилловые линкеры или линкеры, содержащие дисульфид (Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127–131(1992); Патент США № 5208020).

Загрузку цитотоксического лекарственного средства можно контролировать, используя следующие неограничивающие способы, включая:

- (1) осуществление контроля над молярным соотношением связывающего реагента и моноклонального антитела,
- (2) осуществление контроля над временем взаимодействия и температурой,
- (3) отбор разных реакционных реагентов.

Трехбуквенный и однобуквенный коды для аминокислот, используемые в настоящем изобретении, представляют собой такие, как описано в J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968).

Термин «антитело», описанный в данном документе, используется в самом широком смысле и охватывает множество структур антитела, включая, но не ограничиваясь полноразмерными антителами и фрагментами антитела (или антигенсвязывающими фрагментами или антигенсвязывающими группировками), при условии, что они демонстрируют желательную антигенсвязывающую активность. В общем, природное интактное антитело имеет структуру четырех пептидных цепей, образованную посредством соединения двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей межцепочечными дисульфидными связями.

Сконструированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему раскрытию можно получать и очищать традиционными способами. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут

быть клонированы и рекомбинированы в экспрессионный вектор GS. Клетки CHO можно стабильно трансфицировать рекомбинантными экспрессионными векторами иммуноглобулина. В качестве более рекомендуемого предшествующего уровня техники, экспрессионные системы млекопитающего будут приводить к гликозилированию антител, особенно на высоко консервативном N-концевом участке Fc-области. Позитивные клоны размножают в среде, не содержащей сыворотку, биореактора для получения антител. Культуральная среда с секретлируемым антителом может быть очищена посредством общепринятых методик. Например, очистку проводят, используя колонку с сефарозой FF с белком А или G, содержащую подведенный буфер. Неспецифично связанные фракции вымывают. Связанное антитело элюируют способом градиента pH, и фрагменты антитела выявляют посредством SDS-PAGE (от англ. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis - электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и собирают. Антитело можно фильтровать и концентрировать общепринятыми способами. Растворимые смеси и полимеры можно также удалять общепринятыми способами, такими как молекулярные сита и ионный обмен. Полученный продукт нужно сразу же заморозить, например, при -70°C, или лиофилизировать.

Термин «буфер» относится к буферу, который противостоит изменениям в pH за счет действия своих компонентов – сопряженной кислотно-основной пары. Примеры буферов, которые контролируют pH в соответствующем диапазоне, включают ацетат, сукцинат, глюконат, гистидин, оксалат, лактат, фосфат, цитрат, тартрат, fumarат, глицилглицин и другие буферы на основе органических кислот.

«Гистидиновый буфер» представляет собой буфер, содержащий гистидин. Примеры гистидиновых буферов включают гистидин-гистидина гидрохлорид, гистидин-гистидина ацетат, гистидин-гистидина фосфат, гистидин-гистидина сульфат и т.п., и буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина является предпочтительным. Буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина может быть получен из гистидина и соляной кислоты или гистидина и гистидина гидрохлорида.

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

«Сукцинатный буфер» представляет собой буфер, содержащий сукцинат-ионы. Примеры сукцинатных буферов включают янтарную кислоту-сукцинат натрия, янтарную кислоту-сукцинат калия, янтарную кислоту-сукцинат кальция и т.п. Предпочтительный сукцинатный буфер представляет собой янтарную кислоту-сукцинат натрия. Для иллюстрации, янтарная кислота-сукцинат натрия можно получить с помощью янтарной кислоты и гидроксида натрия или с помощью янтарной кислоты и сукцината натрия.

«Фосфатный буфер» представляет собой буфер, содержащий фосфат-ионы. Примеры фосфатных буферов включают динатрия гидрофосфат – дигидрофосфат натрия, динатрия гидрофосфат – дигидрофосфат калия, динатрия гидрофосфат - лимонную кислоту и т.п. Предпочтительный фосфатный буфер представляет собой динатрия гидрофосфат– дигидрофосфат натрия.

«Ацетатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ацетат-ионы. Примеры ацетатных буферов включают уксусную кислоту-ацетат натрия, гистидин-гистидина ацетат, уксусную кислоту-ацетат калия, уксусную кислоту-ацетат кальция, уксусную кислоту-ацетат магния и т.п. Предпочтительный ацетатный буфер представляет собой уксусную кислоту-ацетат натрия.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей один или более конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в данном документе, или их физиологически/фармацевтически приемлемые соли или пролекарства и другие химические компоненты, где данные другие компоненты представляют собой, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества. Целью фармацевтической композиции является поддержание стабильности активного ингредиента антитела и содействие введению в организм, что облегчает поглощение активного ингредиента, осуществляя, таким образом, биологическую активность.

В контексте данного документа термины «фармацевтическая композиция» и «препарат» не являются взаимоисключающими.

Если не указано иное, растворитель в фармацевтической композиции, описанной в данном документе, в форме раствора представляет собой воду.

«Лиофилизированный препарат» относится к препарату или фармацевтической композиции, полученной посредством лиофилизации фармацевтической композиции или препарата в жидкости или форме раствора в вакууме.

Термины «примерно» и «приблизительно» в контексте данного документа означают, что числовое значение находится в пределах приемлемого диапазона

ошибок для конкретного значения, определяемого специалистом в данной области, и данное числовое значение зависит, отчасти, от того, как измеряют или определяют данное значение (то есть границы системы измерения). Например, «примерно» может означать стандартное отклонение в пределах 1 или более чем 1
5 в каждом случае в данной области. Или термин «примерно» или «по существу содержащий» может означать интервал вплоть до 20%. Кроме того, в частности для биологических систем или процессов, данный термин может означать вплоть до порядка величины или вплоть до 5-кратного значения числового значения. Если не
указано иное, когда приведено конкретное значение в настоящей заявке и формуле
10 изобретения, значение термина «примерно» или «по существу содержащий», как следует предполагать, находится в пределах приемлемого диапазона ошибок для того конкретного значения.

Фармацевтическая композиция по настоящему раскрытию может достигать стабильного эффекта: фармацевтическая композиция, в которой конъюгат
15 антитело-лекарственное средство по существу сохраняет свою физическую и/или химическую стабильность и/или биологическую активность после хранения; предпочтительно, фармацевтическая композиция по существу сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также свою биологическую активность после хранения. Период хранения обычно выбирают на основе предварительно
20 определяемого срока годности фармацевтической композиции. Существует множество аналитических методик, доступных в настоящее время, для измерения стабильности белка, и может быть измерена стабильность после хранения на протяжении выбранного периода времени при выбранной температуре.

Стабильные препараты представляют собой препараты, в которых не
25 наблюдается значительного изменения в следующих условиях: хранение при температуре охлаждения ($2-8^{\circ}\text{C}$) в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно 6 месяцев и более предпочтительно 1 года. Кроме того, стабильные жидкие препараты включают жидкие препараты, которые демонстрируют желательные признаки после хранения при температурах, включая
30 25°C , на протяжении периодов, включающих 1 месяц, 2 месяца и 3 месяца. Кроме того, стабильные жидкие препараты включают жидкие препараты, которые демонстрируют желательные признаки после хранения при температурах, включающих 40°C , на протяжении периодов, включающих 10 суток, 20 суток и 1
35 месяц. Типичные примеры в отношении стабильности выглядят следующим образом: обычно не больше чем примерно 10%, предпочтительно не больше чем примерно 5% мономеров антитела агрегируют или деградируют, как измерено

5 посредством SEC-ВЭЖХ (от англ. SEC - size exclusion chromatography – эксклюзионная хроматография). Препарат представляет собой бледно-желтую, почти бесцветную и прозрачную жидкость или бесцветную или прозрачную - немного опалесцентную, согласно визуальному анализу. Концентрация, pH и осмольность препарата изменяются не больше чем на $\pm 10\%$. Обычно, наблюдают уменьшение не более чем на примерно 10%, предпочтительно не более чем на примерно 5%. Обычно, образуется агрегирование не больше чем на примерно 10%, предпочтительно не больше чем на примерно 5%.

10 Конъюгат антитело-лекарственное средство «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если он не демонстрирует значительного увеличения в агрегировании, осаждении и/или денатурации при визуальном исследовании цвета и/или прозрачности, или как измеряется посредством рассеяния УФ-света, эксклюзионной хроматографии (SEC) и динамического рассеяния света (DLS - от англ. dynamic light scattering). Изменения в конформации белка можно оценивать посредством флуоресцентной спектроскопии (которая определяет третичную структуру белка) и посредством FTIR-спектроскопии (от англ. Fourier transform infrared spectroscopy - инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) (которая определяет вторичную структуру белка).

20 Конъюгат антитело-лекарственное средство «сохраняет свою химическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если он не демонстрирует значительного химического изменения. Химическую стабильность можно оценивать посредством выявления и количественного определения химически измененных форм белка. Процессы деградации, которые часто меняют химическую структуру белков, включают гидролиз или расщепление (оценивается способами, такими как эксклюзионная хроматография и CE-SDS (от англ. Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate - капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия)), окисление (оценивается способами, такими как пептидное картирование в совокупности с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS (от англ. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry - Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией)), дезамидирование (оценивается способами, такими как ионно-обменная хроматография, капиллярная изоэлектрическая фокусировка, пептидное картирование и измерение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризацию (оценивается по измерению содержания изоаспарагиновой кислоты, посредством пептидного картирования и т.д.).

Конъюгат антитело-лекарственное средство «сохраняет свою биологическую активность» в фармацевтическом препарате, если биологическая активность конъюгата антитело-лекарственное средство в данный момент времени находится в пределах заданного диапазона биологической активности, демонстрируемой в момент времени, когда был получен фармацевтический препарат.

Термин «возможный» или «возможно» означает, что событие или ситуация, описанная впоследствии, может происходить, но не обязательно происходит, и что описание включает примеры, в которых событие или ситуация происходит или не происходит. Например, фраза «возможно содержащий 1-3 переменную(ые) область(ти) тяжелой цепи антитела» означает, что переменная область тяжелой цепи антитела конкретной последовательности может существовать, но не обязательно существует.

«Замещенный» означает, что один или более, предпочтительно вплоть до 5, более предпочтительно от 1 до 3 атомов водорода в группе независимо замещены соответствующим числом заместителей. Само собой разумеется, что заместитель находится только в своем возможном химическом положении, и специалисты в данной области будут способны определять (экспериментально или теоретически) возможное или невозможное замещение без чрезмерных усилий. Например, может быть нестабильным, когда амино- или гидроксид-, имеющие свободный водород, связаны с атомом углерода, имеющим незамещенную (например, олефиновую) связь.

Для получения общепринятых фармацевтических композиций см. Китайскую Фармакопею.

Термин «носитель» для лекарственного средства по настоящему раскрытию относится к системе, которая может изменять то, как лекарственное средство поступает в организм человека, и распределение лекарственного средства в организме человека, контроль над скоростью высвобождения лекарственного средства и доставку лекарственного средства к органу-мишени. Высвобождение носителя лекарственного средства и система направленной доставки могут уменьшать деградацию и потерю лекарственного средства, уменьшать побочные эффекты и улучшать биодоступность. Например, полимерные поверхностно-активные вещества, которые могут быть использованы в качестве носителей, могут подвергаться самосборке за счет своих уникальных амфифильных структур с образованием разных форм агрегатов, таких как мицеллы, микроэмульсии, гели, жидкие кристаллы и везикулы, в качестве предпочтительных примеров. Агрегаты обладают способностью инкапсулировать молекулы лекарственных средств и

обладают хорошей проницаемостью в отношении мембран и, таким образом, могут быть использованы в качестве превосходных носителей лекарственных средств.

Термины «введение» и «обработка» при применении к животным, человеку, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относятся к приведению экзогенного лекарственного средства, терапевтического средства, диагностического средства или композиции в контакт с животными, человеком, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями. Термины «введение» и «обработка» могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клеток включает приведение реагента в контакт с клетками, и приведение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клетками. Термины «введение» и «обработка» также относятся к обработке, например, клеток, реагентами, диагностическим средством, связывающими композициями или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. Термин «обработка», при применении к субъекту-человеку, субъекту ветеринарии или субъекту исследования, относятся к терапевтическому лечению, превентивным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим применениям.

Термин «лечение» относится к введению внутрь или наружно терапевтического средства, такого как композиция, содержащая любое из соединений конъюгации по настоящему раскрытию, пациенту с одним или более симптомами заболевания, в отношении которого данное терапевтическое средство, как известно, оказывает терапевтическое действие. Типично терапевтическое средство вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у пациента или популяции, подлежащей лечению, вызывая регресс таких симптомов или подавляя прогрессирование таких симптомов до какой-либо клинически измеряемой степени. Количество терапевтического средства, эффективное для облегчения какого-либо конкретного симптома заболевания (также известное как «терапевтически эффективное количество»), может варьировать в зависимости от множества факторов, например, течения заболевания, возраста и массы пациента, и способности лекарственного средства оказывать желаемое терапевтическое действие у пациента. Был ли облегчен симптом заболевания можно оценить посредством любых клинических способов тестирования, обычно используемых лечащими врачами или другими квалифицированными медицинскими работниками, для оценки тяжести или прогрессирования данного симптома. Несмотря на то, что воплощения настоящего

раскрытия (например, способы лечения или изделия) могут не быть эффективными в облегчении симптомов каждого интересующего заболевания, но, как определено в соответствии с любыми методами статистического тестирования, известными в данной области, такими как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Краскела - Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхир-Терпстры и критерий Уилкоксона, они будут уменьшать симптомы интересующего заболевания у статистически значимого числа пациентов.

Термин «эффективное количество» включает количество, достаточное для облегчения или предупреждения симптома или состояния медицинского заболевания. Эффективное количество также относится к количеству, достаточному для того, чтобы обеспечить или облегчить диагностирование. Эффективное количество для конкретного пациента или субъекта ветеринарии может варьировать, в зависимости от факторов, таких как состояние, подлежащее лечению, общее состояние здоровья пациента, способ или путь и дозировка введения и тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или схему введения, позволяющую избежать значительных побочных эффектов или токсичных воздействий.

Термин «замена» относится к замене системы растворителя, которая солюбилизирует белок антитела. Например, высокосолевою или гипертоническую систему растворителя, содержащую белок антитела, заменяют посредством физических операций на буферную систему стабильного препарата, таким образом, чтобы белок антитела находился в стабильном препарате. Данные физические операции включают ультрафильтрацию, диализ или восстановление после центрифугирования, но не ограничиваются ими.

25

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показаны результаты ADC-активности по неспецифическому уничтожению клеток на смеси клеток VxPC3 и MiaPaCa2.

30

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее раскрытие дополнительно описано ниже со ссылкой на примеры, которые, однако, не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия. Экспериментальные способы в разделе Примеры настоящего раскрытия, в которых конкретным образом не указаны конкретные условия, обычно осуществляют в общепринятых условиях, например, ссылаясь на *Antibodies: A Laboratory Manual and Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

35

YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:
 5;

Легкая цепь TINA:

5 *DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS*
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO: 6.

10

II. Получение ADC

Анализ загрузки лекарственным средством маточного раствора ADC

ADC представляет собой лекарственное средство, перекрестно сшитое с
 антителом, и механизм лечения заболеваний посредством него заключается в
 15 транспортировке молекул токсина в клетки, в зависимости от эффективности
 нацеливания антитела, таким образом, чтобы уничтожить данные клетки. Загрузка
 лекарственным средством играет решающую роль в эффективности данного
 лекарственного средства.

1. Способ расчета на основе УФ-вид

20 Загрузку лекарственным средством маточного раствора ADC определяли,
 используя УФ-способ.

Порядок проведения эксперимента

Кюветы, содержащие буфер на основе сукцината натрия, по отдельности
 помещали в эталонную ячейку и ячейку для образца, и вычитали значение
 25 поглощения холостой пробы растворителя. Затем, кювету, содержащую раствор
 тестируемого образца, помещали в ячейку для образца, и определяли значения
 поглощения при 280 нм и 370 нм.

Расчет результатов

30 Емкость загрузки маточного раствора ADC определяли посредством
 ультрафиолетовой спектрофотометрии (прибор: ультрафиолетовый
 спектрофотометр Thermo panodrop2000), на основе принципа, заключающегося в
 том, что суммарное значение поглощения маточного раствора ADC при
 определенной длине волны равно сумме значения поглощения цитотоксического
 лекарственного средства и моноклонального антитела при определенной длине
 35 волны, а именно:

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

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

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

5 $\epsilon_{\text{mab-280}}$: средний молярный коэффициент экстинкции маточного раствора моноклонального антитела при 280 нм 214600;

C_{mab} : концентрация маточного раствора моноклонального антитела;

b : оптическая длина пути 1 см.

10 Аналогично, уравнение суммарного значения поглощения образца при 370 нм может выглядеть следующим образом

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

$\epsilon_{\text{лекарственное средство-370}}$: средний молярный коэффициент экстинкции лекарственного средства при 370 нм 19000;

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

15 $\epsilon_{\text{mab-370}}$: коэффициент экстинкции маточного раствора моноклонального антитела при 370 нм 0;

C_{mab} : концентрация маточного раствора моноклонального антитела;

b : оптическая длина пути 1 см.

20 Загрузка лекарственным средством может быть рассчитана, используя оба уравнения (1) и (2), а также коэффициенты экстинкции моноклонального антитела и лекарственного средства при обеих длинах волн и их концентрациях.

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

2. Способ расчета CE-SDS

25 Реагенты и проборы

30 Выбирали набор для анализа SDS-Mw, производимый Beckman, кат. № 390953, и содержащий буфер для разделения в геле SDS-MW, буфер для образца SDS-MW, кислый раствор для очистки (0,1 моль/л раствор соляной кислоты), основной раствор для очистки (раствор гидроксида натрия 0,1 моль) и вещество для внутреннего стандарта (10 кДа). Выбирали также набор SDS, производимый Технологическим институтом Пекина BioCEart, кат. № BSYK018, и содержащий буфер для геля CE-SDS и буфер для образца CE-SDS.

35 Раствор для алкилирования (раствор йодацетамида 0,25 моль): взвешивали примерно 0,046 г йодацетамида, 1 мл воды высшей степени очистки добавляли для растворения и хорошего перемешивания, и полученный раствор хранили при 2–8°C в течение 7 суток в темноте.

Прибор для капиллярного электрофореза: PA800plus от SCIEX.

Капилляры: кварцевый капилляр без покрытия (с внутренним диаметром 50 мкм), резали до получения общей длины 30,2 см и длины эффективного разделения способом с высокой разрешающей способностью, 20 см.

5 Получение раствора тестируемого образца

Тестируемый образец разводили до 1 мг/мл буфером для образца SDS. Брали 95 мкл раствора тестируемого образца (1 мг/мл) и добавляли к ним 5 мкл водного раствора йодацетамида (0,8 моль/л), и полученный раствор встряхивали на вортексе и хорошо перемешивали. Брали 95 мкл холостого контроля и добавляли к
10 ним 5 мкл 0,8 моль/л водного раствора йодацетамида, и полученный раствор встряхивали на вортексе и хорошо перемешивали. 75 мкл образцов отбирали из пробирок с образцом и добавляли во флаконы для образца и сразу же подвергали анализу.

Способ определения

15 1) Предварительная обработка капилляров: промывали раствором гидроксида натрия, 0,1 моль/л, под давлением 413,7 кПа в течение 3 мин, затем промывали раствором соляной кислоты, 0,1 моль/л, под давлением 413,7 кПа в течение 2 мин и, наконец, промывали чистой водой под давлением 482,6 кПа в течение 1 мин. Упомянутую выше предварительную обработку следует проводить
20 перед каждой операцией.

2) Предварительное наполнение капилляров: промывали буфером для разделения в геле SDS под давлением 344,7 кПа в течение 15 мин. Упомянутую выше предварительную обработку следует проводить перед каждой операцией.

Введение образца: электрокинетический ввод образца проводили при 10 кВ
25 обратной полярности, и уменьшенный образец вводили на протяжении 20 с.

Разделение: разделение проводили при 15 кВ обратной полярности в течение 40 мин.

Температура камеры для образцов: от 18°C до 25°C.

Температура капилляров: от 18°C до 25°C.

30 Анализ результатов

Данные анализировали посредством использования программного обеспечения от Beckman на основе связывания соответствующего лекарственного средства на сульфгидриле, высвобождаемом из открытой дисульфидной связи в антителе, и рассчитывали часть скорректированной площади пика, как например,
35 тяжелая цепь, негликозилированная тяжелая цепь и легкая цепь в сумме всех скорректированных площадей пиков. Формула расчета: $DAR = [4 \times \text{площадь пика}]$

тяжелой цепи (H) + 2 × площади пика половины антитела (H-L) + 4 × площадь пика удвоенной тяжелой цепи (H-H) + 2 × площадь пика тяжелой цепи-легкой цепи (H-H-L)]/[площадь пика тяжелой цепи (H) /2 + площадь пика половины антитела (H-L) /2 + площадь пика двойной тяжелой цепи (H-H) + площадь пика тяжелой цепи-легкой цепи (H-H-L) + площадь пика полноразмерного антитела], и, наконец, рассчитывали средневзвешенное значение ADC.

III. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ)

1. Реагенты и проборы:

10 Система ВЭЖХ: Система СВЭЖХ сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Waters H-Class

Детектор: УФ-детектор с перестраиваемой длиной волны (TUV - от англ. tunable ultraviolet detector) (длина волны измерения: 280 нм)

15 Хроматографическая колонка: BioResolve RP mAb Polyphenyl (2,7 мкм 4,6 × 150 мм)

2. Условия выявления:

Температура колонки: 80°C

Скорость потока: 1,0 мл/мин

20 Подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота + 0,025% водный раствор трифторуксусной кислоты (TFA - от англ. trifluoroacetic acid)

Подвижная фаза В: 0,1% FA + 0,025% трифторуксусная кислота (TFA) в ацетонитриле

25 Программа градиента: 27,0% В-45,0% В (от 0,00 мин до 12,00 мин), 45,0% В-80,0% В (от 12,00 мин до 13,00 мин), 80,0% В-80,0% В (от 13,00 мин до 15,00 мин), 27,0% В-27,0% В (от 15,04 мин до 20,00 мин)

Количество вводимого образца: 5,0 мкл

3. Анализ данных

30 По сравнению с легкой цепью антитела (L0) и тяжелой цепью антитела (H0), не связанной с лекарственными средствами, гидрофобность легкой цепи, связанной с лекарственным средством (легкая цепь, связанная с 1 лекарственным средством: L1) и тяжелых цепей, связанных с лекарственным средством (тяжелая цепь, связанная с 1 лекарственным средством: H1, тяжелая цепь, связанная с 2 лекарственными средствами: H2, тяжелая цепь, связанная с 3 лекарственными средствами: H3, тяжелая цепь, связанная с 4 лекарственными средствами: H4)

35 увеличивалась прямо пропорционально числу лекарственных средств, связанных с ними, и время удерживания увеличивалось. Таким образом, элюирование можно

проводить в следующем порядке L₀, L₁, H₀, H₁, H₂, H₃ и H₄. По сравнению со временем удерживания L₀ и H₀, пик выявления присваивали любому из L₀, L₁, H₀, H₁, H₂, H₃ и H₄.

5 Поскольку линкеры лекарственного средства поглощали УФ, полученную площадь пика корректировали в соответствии с числом связанных лекарственных средств, используя молярные коэффициенты поглощения легких цепей, тяжелых цепей и линкеров лекарственного средства в соответствии со следующим выражением. Формула расчета выглядит следующим образом:

10 Легкая цепь ($\epsilon_{LC-280} / (\epsilon_{LC-280} + \text{число связанных лекарственных средств} \times \epsilon_{\text{лекарственного средства-280}})$)

Тяжелая цепь ($\epsilon_{HC-280} / (\epsilon_{HC-280} + \text{число связанных лекарственных средств} \times \epsilon_{\text{лекарственного средства-280}})$)

Примечание: ϵ_{LC-280} представляет собой молярный коэффициент экстинкции легкой цепи при 280 нм;

15 ϵ_{HC-280} представляет собой молярный коэффициент экстинкции тяжелой цепи при 280 нм;

$\epsilon_{\text{лекарственного средства-280}}$ представляет собой молярный коэффициент экстинкции токсина при 280 нм.

20 Таблица 1. Таблица расчета загрузки лекарственным средством на основе обращенно-фазовой хроматографии

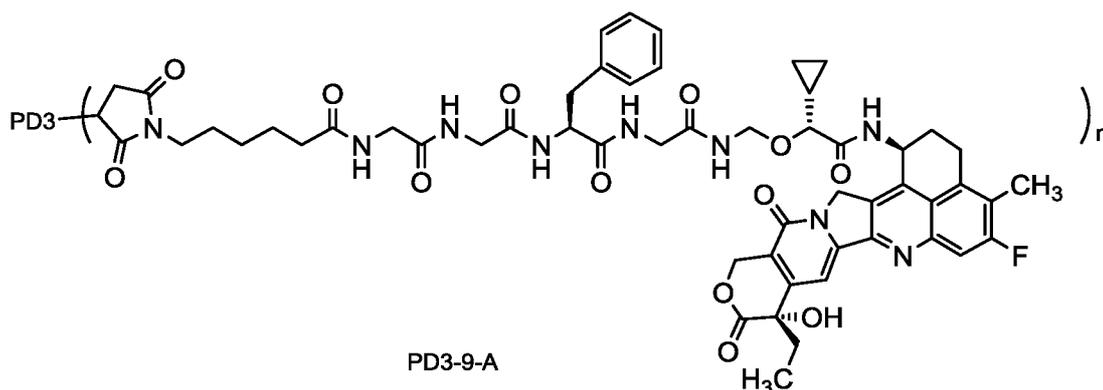
Название	Число связанных лекарственных средств	Процент скорректированной площади пика
L ₀	0	100 × скорректированная площадь пика L ₀ / общая скорректированная площадь пика LC
L ₁	1	100 × скорректированная площадь пика L ₁ / общая скорректированная площадь пика LC
H ₀	0	100 × скорректированная площадь пика H ₀ / общая скорректированная площадь пика HC
H ₁	1	100 × скорректированная площадь пика H ₁ / общая скорректированная площадь пика HC
H ₂	2	100 × скорректированная площадь пика H ₂ / общая скорректированная площадь пика HC
H ₃	3	100 × скорректированная площадь пика H ₃ / общая скорректированная площадь пика HC
H ₄	4	100 × скорректированная площадь пика H ₄ / общая скорректированная площадь пика HC

Примечание: общая скорректированная площадь пика LC = скорректированная площадь пика L₀ + скорректированная площадь пика L₁.

Общая скорректированная площадь пика $HC =$ скорректированная площадь пика $H_0 +$ скорректированная площадь пика $H_1 +$ скорректированная площадь пика $H_2 +$ скорректированная площадь пика $H_3 +$ скорректированная площадь пика H_4 , и загрузку лекарственным средством ADC рассчитывают следующим образом:

- 5 Загрузка лекарственным средством $n = 2 \times \Sigma$ (число связанных лекарственных средств \times процент скорректированной площади пика)/100

Пример получения 2-1 ADC-1



10

К водному буферу PBS (от англ. phosphate buffered saline - фосфатно-солевой буферный раствор) антитела PD3 (0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 4,0 мл, 270 нмоль) при 37°C добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 67,5 мкл, 675 нмоль). Реакционную смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 37°C в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

15

Соединение 9-A (полученное в соответствии с 9-A Примера 9 в описании WO2020063676A1, 2,9 мг, 2700 нмоль) растворяли в 180 мкг ДМСО (Диметилсульфоксид), и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси, которую затем встряхивали на водяной бане-шейкере при 25°C в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М буфер PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота)) с получение иллюстративного продукта ADC-1 PD3-9-A в буфере PBS

20

25

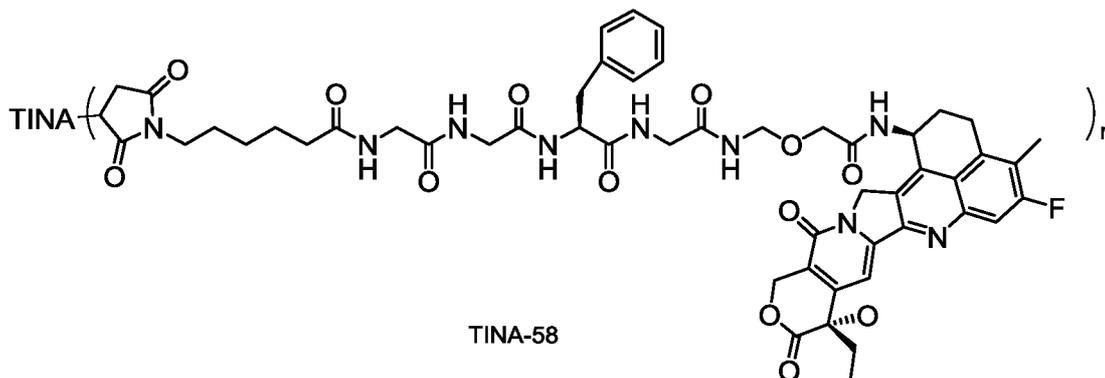
(1,93 мг/мл, 18,4 мл), который затем хранили при 4°C. Среднее значение, рассчитанное по УФ и видимой областям спектра: $n = 3,77$.

Пример получения 2-2 ADC-2

продукта ADC-3 (20 г/л, 132,20 г, выход: 91,0%, среднее значение, рассчитанное посредством обращенно-фазовой хроматографии: $n = 4,0$), показанного как PD3-9-A; В конечном итоге получали лиофилизированный порошок в количестве 80 мг/бутылка.

5

Пример получения 2-4 ADC-4



Синтез осуществляли в соответствии с Примером 19, изложенным в WO2015098099.

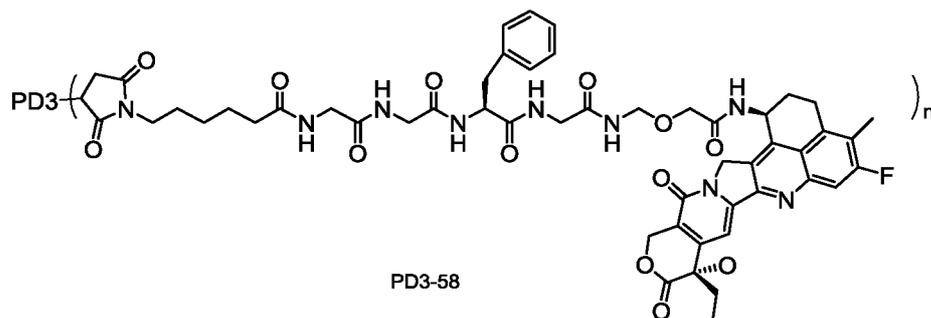
К водному буферу PBS антитела TINA (0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 2,0 мл, 135,4 нмоль) при 37 °С добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 33,8 мкл, 338 нмоль). Реакционную смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 37°С в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь охлаждали до 25°С на водяной бане.

Соединение 58 (1,4 мг, 1354 нмоль) растворяли в 70 мкл ДМСО, и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси, которую затем встряхивали на шейкере-водяной бане при 25°С в течение 3 ч до окончания реакции. Реакционную смесь обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М буфер PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением иллюстративного указанного в заголовке продукта **ADC-4** TINA-58 в буфере PBS (1,13 мг/мл, 15,1 мл), который затем хранили при 4°С.

Среднее значение, рассчитанное по УФ и видимой областям спектра: $n = 3,99$.

25

Пример получения 2-5 ADC-5

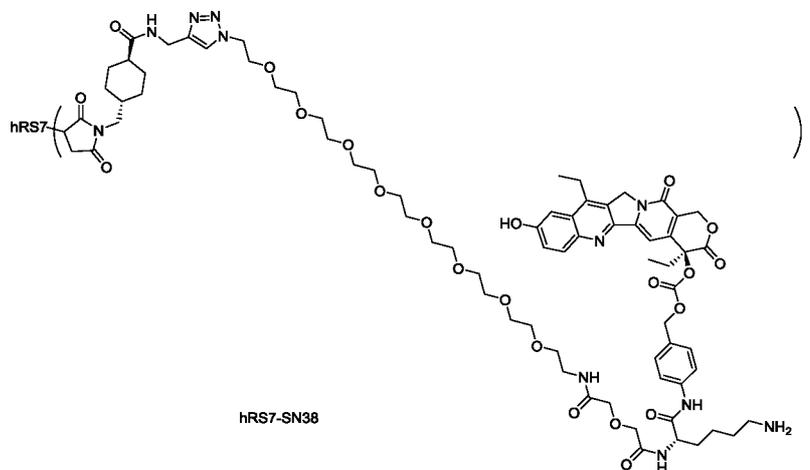


К водному буферу PBS антитела **PD3** (0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,5 мл, 101,4 нмоль) при 37°C добавляли полученный водный раствор трис(2-карбокsetил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 25,3 мкл, 253 нмоль). Реакционную смесь встряхивали на шейкере-водяной бане при 37°C в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение 58 (1,05 мг, 1014 нмоль, в соответствии с Примером 58 на странице 163 патентной заявки CN104755494A) растворяли в 60 мкл ДМСО, и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси, которую затем встряхивали на шейкере-водяной бане при 25°C в течение 3 ч до окончания реакции. Реакционную смесь обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М буфер PBS при pH 6,5) с получением иллюстративного, указанного в заголовке продукта **ADC-5** PD3-58 в буфере PBS (0,82 мг/мл, 13,5 мл), который затем хранили при 4°C.

Среднее значение, рассчитанное по УФ и видимой областям спектра: $n = 3,88$.

Пример получения 2-6 ADC-6

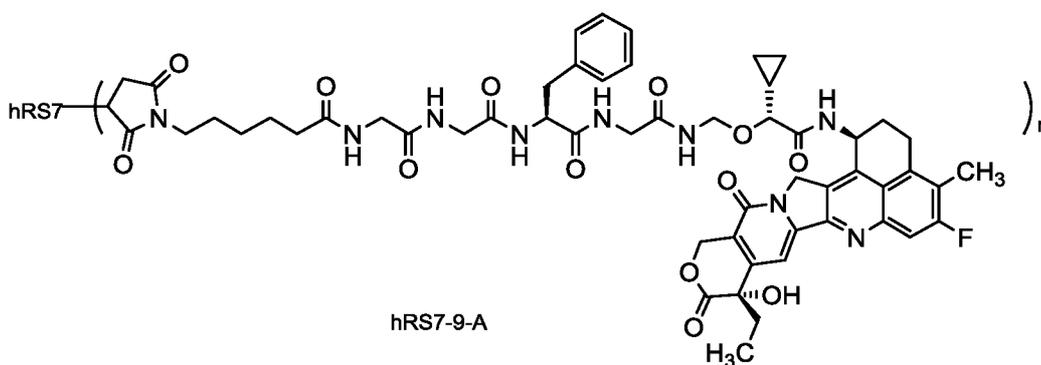


К водному буферу PBS антитела **hRS7** (0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,4 мл, 94,60 нмоль) при 37°C добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) (10 mM, 50,1 мкл, 501 нмоль). Реакционную смесь встряхивали на шейкере-водяной бане при 37°C в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение **SN38** (синтезированное в соответствии с Примером 1 на странице 59 патентной заявки CN105407891A, 2,1 мг, 1419 нмоль) растворяли в 50 мкл ДМСО, и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси, которую затем встряхивали на шейкере-водяной бане при 25°C в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М буфер PBS при pH 6,5) с получением иллюстративного указанного в заголовке продукта **ADC-6 hRS7-SN38** в буфере PBS (1,03 мг/мл, 11,5 мл), который затем хранили при 4°C.

Среднее значение, рассчитанное в соответствии с CE-SDS: $n = 7,56$.

Пример получения 2-7 ADC-7



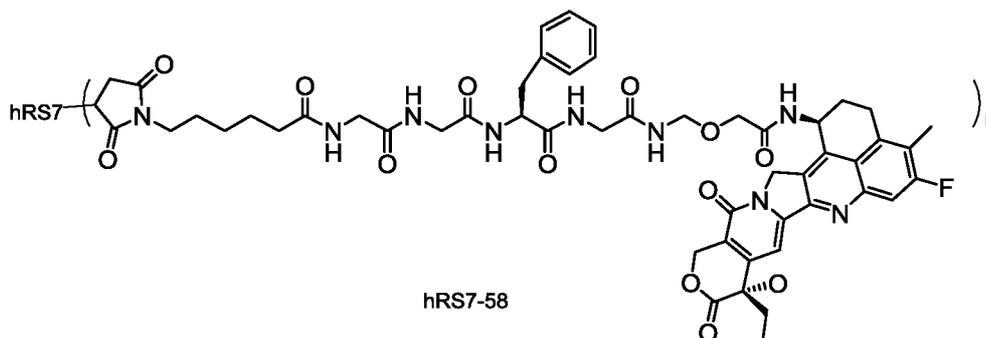
К водному буферу PBS антитела **hRS7** (0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 2,18 мл, 147,3 нмоль) при 37°C добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) (10 mM, 36,8 мкл, 368 нмоль). Реакционную смесь встряхивали на шейкере-водяной бане при 37°C в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение **9-A** (1,58 мг, 1471 нмоль) растворяли в 100 мкл ДМСО, и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси, которую затем встряхивали на шейкере-водяной бане при 25°C в течение 3 ч до окончания реакции. Реакционную смесь обессоливали и очищали посредством колонки с гелем

Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М буфер PBS при pH 6,5) с получением иллюстративного указанного в заголовке продукта **ADC-7 hRS7-9-A** в буфере PBS (1,10 мг/мл, 16,4 мл), который затем хранили при 4°C.

Среднее значение, рассчитанное по УФ и видимой областям спектра: $n = 3,72$.

Пример получения 2-8 ADC-8



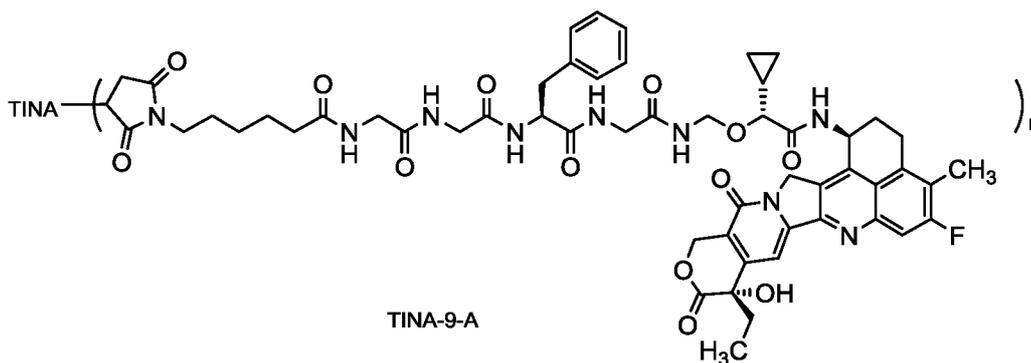
10 К водному буферу PBS антитела **hRS7** (0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 2,18 мл, 147,3 нмоль) при 37°C добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) (10 мМ, 36,8 мкл, 368 нмоль). Реакционную смесь встряхивали на шейкере-водяной бане при 37°C в течение 3 ч до окончания реакции. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

15 Соединение 58 (1,52 мг, 1473 нмоль, в соответствии с Примером 58 на странице 163 патентной заявки CN104755494A) растворяли в 100 мкл ДМСО, и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси, которую затем встряхивали на шейкере-водяной бане при 25°C в течение 3 ч до окончания реакции. Реакционную смесь обессоливали и очищали посредством колонки с гелем
20 Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М буфер PBS при pH 6,5) с получением иллюстративного указанного в заголовке продукта **ADC-8 hRS7-58** в буфере PBS (1,02 мг/мл, 16,8 мл), который затем хранили при 4°C.

Среднее значение, рассчитанное по УФ и видимой областям спектра: $n = 3,93$.

25

Пример получения 2-9 ADC-9



К водному буферу PBS антитела **TINA** (0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 0,95 мл, 64,2 нмоль) при 37°C добавляли полученный водный раствор

5 трис(2-карбоксиил)фосфина (TCEP) (10 мМ, 16,0 мкл, 160 нмоль). Реакционную смесь встряхивали на шейкере-водяной бане при 37°C в течение 3 ч перед окончанием реакции. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане. Соединение **9-A** (0,69 мг, 642 нмоль) растворяли в 30 мкл ДМСО, и полученный

10 раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси, которую затем встряхивали на шейкере-водяной бане при 25°C в течение 3 ч перед завершением реакции. Реакционную смесь обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М буфер PBS при pH 6,5) с получением иллюстративного указанного в заголовке продукта **ADC-9 TINA-9-A** в буфере PBS (0,99 мг/мл, 7,0 мл), который затем хранили при 4°C.

15 Среднее значение, рассчитанное по УФ и видимой областям спектра: $n = 3,99$.

Активность антител и конъюгатов по настоящему раскрытию проверяли способами биохимического тестирования.

20 **Пример тестирования 1: Анализ уровня связывания антитела с белком**

Белок hTROP-2 разводили до концентрации 1 мкг/мл буфером PBS при pH 7,4 (Shanghai BasalMedia Technologies Co., LTD., B320), добавляли в 96-луночный микропланшет в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 4°C в течение

ночи. После отбрасывания жидкости, 300 мкл 5%-ного обезжиренного молока (BD, 232100), разведенного PBS, добавляли в каждую лунку для блокирования, и данную

25 смесь инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и планшет промывали 3 раза буфером PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,1% твин-20). 100 мкл раствора антитела, разведенного в градиенте, добавляли в каждую лунку, и данную смесь инкубировали при 37°C в

течение 1 ч. После завершения инкубации, планшет промывали 3 раза PBST. 100 мкл мышиного антитела против человеческого IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 209-035-088, разведение 1:8000) добавляли в каждую лунку, и данную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После 3-х кратной промывки планшета 5 буфером PBST 100 мкл хромогенного субстрата TMB (от англ. tetramethylbenzidine - тетраметилбензидин) (KPL, 5120-0077) добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 10–15 мин, и реакцию завершали 10 посредством добавления в каждую лунку 50 мкл 1 М H₂SO₄. Значение поглощения в планшете выявляли при 450 нм, используя микропланшет-ридер, кривые связывания антител с антигеном строили посредством программного обеспечения, и рассчитывали значение EC₅₀. Активность связывания антител с белками показана в Таблице 2.

Таблица 2. Активность связывания антител с белком

Антитело	PD3	hRS7	TINA
E _{max} (значение OD)	1,40	1,37	1,39
EC ₅₀ (нМ)	13,6	18,29	16,14

15

Результат показывает, что антитело PD3 в настоящей заявке обладает более высокой активностью связывания с белком hTROP-2.

Пример тестирования 2: Анализ уровня связывания антител с клетками

20

Стабильно трансфицированные TROP-2-экспрессирующие клетки CHO-K1 суспендировали в буфере FACS (2%-ная фетальная телячья сыворотка (Gibco, 10099141) pH 7,4 PBS (Sigma, P4417-100TAB)) с получением 1 × 10⁶/мл клеточной суспензии, которую затем добавляли в 96-луночный круглодонный планшет в количестве 100 мкл/лунка. После центрифугирования и удаления супернатанта, 25 тестируемые антитела, разведенные буфером FACS до разных концентраций, добавляли в количестве 50 мкл/лунка. Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4°C в течение 1 ч. Планшет 3 раза промывали буфером FACS посредством центрифугирования при 300 g, и добавляли антитело козы против человеческого IgG (H+L), меченное Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A-11013), в рабочей 30 концентрации. Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4°C в течение 40 мин. Планшет 3 раза промывали буфером FACS посредством центрифугирования при 300 g и тестировали на проточном цитометре BD FACSCantoII в отношении среднего геометрического интенсивности флуоресценции

50 мкл СТГ добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте, и значения хемилюминесценции выявляли, используя Victor3. Эндоцитозная активность антитела показана в Таблице 4.

5 Таблица 4. Эндоцитозная активность антитела

Антитело	PD3	hRS7	TINA
E_{max}	99,1%	98,5%	98,7%
EC_{50} (нМ)	0,15	0,18	0,18

Результаты показывают, что антитело PD3 в настоящей заявке обладает более высокой эндоцитозной активностью.

10 **Пример тестирования 4: Анализ аффинности антитела**

Аффинность антитела к TROP-2 выявляли в виде захватывающего антитела. Антитело подвергалось аффинному захвату биосенсорным чипом с Белком А (кат. № 29127556, GE), конъюгированным с антителом против человеческого IgG (кат. № BR-1008-39, серия № 10260416, GE), затем антиген hTROP-2 пропусклся через поверхность данного чипа, и прибор Biacore T200 использовали для выявления сигналов взаимодействия в реальном времени с получением, таким образом, кривых ассоциации и диссоциации. После завершения диссоциации для каждого цикла анализа, чип отмывали дочиста и регенерировали посредством буфера для регенерации, глицином 1,5 (кат. № BR100354, GE) или 3 М $MgCl_2$ (из набора для захвата человеческих антител, кат. № BR100839, GE). После завершения анализа, данные аппроксимировали с помощью модели Ленгмюра (1:1), используя GE Biacore T200, ознакомительную версию 3.0, с получением значений аффинности. Аффинность антитела к белкам представлена в Таблице 5.

25 Таблица 5. Аффинность антитела, определяемая посредством Biacore

Антитело	PD3	hRS7	TINA
KD (M)	6,86E-10	9,87E-10	2,15E-8

Результаты показывают, что антитело PD3 в настоящей заявке обладает более высокой аффинностью к hTROP-2.

30 **Пример тестирования 5: Активность молекул ADC в отношении клеток**

Клетки, используемые в данном анализе, выглядели следующим образом: FaDu(+++), приобретенные у ATCC, кат. № HTB-43™; HCC827(+++), приобретенные

у ATCC, кат. № CRL-2868; Colo205(++), приобретенные у Банка клеток, Китайская академия наук, кат. № TCHu102; DMS53(++), приобретенные у ATCC, кат. № CRL-2062™; SK-OV-3(+), приобретенные у ATCC, кат. № HTB-77; CHO-K1(-), приобретенные у ATCC, кат. № CCL-61™; где «+» представляет экспрессируемое количество TROP-2 в популяции клеток, больше «+» означает, что экспрессируемое количество TROP-2 больше, и «-» означает, что TROP-2 не экспрессируется.

Суспензию клеток получали посредством свежей культуральной среды, содержащей 10% FBS при плотности клеток 3703 клеток/мл, и добавляли в 96-луночный планшет для клеточных культур в количестве 135 мкл/лунка и инкубировали с 5% диоксида углерода при 37°C в течение 16 ч. Образцы ADC готовили посредством PBS таким образом, что имели концентрацию 5 мкМ. Данную концентрацию брали в качестве исходной концентрации, и образец в 5 раз разводили PBS с получением в общей сложности 8 концентраций. 15 мкл указанного выше раствора ADC добавляли в каждую лунку. Планшет культивировали при 37°C в 5% диоксиде углерода в течение 6 суток. 70 мкл CTG добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте, значения хемилюминесценции выявляли, используя Victor3, и анализ данных проводили, используя программное обеспечение GraphPad Prism.

Результат показывает, что ADC-1 оказывает более сильный цитотоксический эффект, и данный эффект уничтожения положительно коррелирует с уровнем экспрессии TROP-2 на поверхности опухолевой клетки.

Таблица 6. Уничтожающая активность ADC на клетках с разными уровнями экспрессии TROP-2

Образец	FaDu		HCC827		Colo205		DMS53		SK-OV-3		CHO-K1	
	EC ₅₀ (нМ)	E _{max} (%)										
ADC-1	0,23	100,42	0,14	89,64	39,23	99,38	42,46	89,39	н.д.	61,91	н.д.	9,31
ADC-4	0,53	101,25	0,27	88,16	59,8	99,66	75,58	89,83	н.д.	49,15	н.д.	1,71
ADC-7	0,31	100,75	0,18	89,33	52,75	99,52	72,92	88,74	н.д.	66,11	н.д.	8,69

н.д. – нет данных

Второй анализ параллельного сравнения проводили в способе, как описано выше, и полученные результаты выглядят следующим образом:

Таблица 7. Уничтожающая активность ADC на клетках с разными уровнями экспрессии TROP-2

	FaDu		HCC827		Colo205		DMS53	
Образец	EC ₅₀ (нМ)	E _{max} (%)						
ADC-1	0,08	101,6	0,06	89,57	12,07	100,34	15,08	93,24
ADC-5	0,14	101,58	0,13	88,23	25,63	99,64	25,71	92,47

Пример тестирования 6: Исследование неспецифической уничтожающей активности

Клетки ВхРС3 (раковые клетки поджелудочной железы человека, ATCC, CRL-1687) и клетки MiaPaCa2 (раковые клетки поджелудочной железы человека, bioscytogen, В-HCL-014) культивировали с RPMI1640+10% FBS и DMEM/высокое содержание глюкозы + 10% FBS, соответственно; клетки подвергали воздействию трипсина, нейтрализовали свежей средой и центрифугировали при 1000 об./мин. в течение 3 мин; супернатант отбрасывали, и клетки ресуспендировали посредством RPMI1640+10% FBS. После подсчета клеток плотность клеток ВхРС3 регулировали до получения 6×10^4 клеток/мл, и плотность клеток MiaPaCa2-luc регулировали до получения $1,5 \times 10^4$ клеток/мл. 500 мкл клеток ВхРС3 и 500 мкл клеток MiaPaCa2-luc добавляли в каждую лунку 12-луночного планшета 1. 500 мкл клеток Mi-aPaCa2-luc и 500 мкл среды RPMI1640, содержащей 10%-ную сыворотку FBS, добавляли в 12-луночный планшет. 2. Планшеты культивировали при 37°C в 5% диоксида углерода в течение 24 ч.

Образцы ADC готовили в концентрации 40× промежуточных растворов (0,2 мкМ). 25 мкл указанных выше образцов отбирали и добавляли в соответствующую лунку 12-луночных планшетов. Устанавливали контрольную группу растворителя. Планшеты культивировали при 37°C в 5% диоксида углерода в течение 6 суток. Клетки в 12-луночных планшетах подвергали действию трипсина, нейтрализовали свежей средой и центрифугировали при 1000 об./мин. в течение 3 мин. Супернатант отбрасывали, и клетки ресуспендировали в 1 мл буфера FACS (PBS + 2,5% FBS). 20 мкл клеток отбирали и окрашивали 20 мкл трипанового синего и подсчитывали. Клетки в планшете 1 центрифугировали при 1000 об./мин. в течение 3 мин, супернатант отбрасывали, клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS, добавляли 2 мкл моноклонального антитела против TROP-2 (EGP-1) (MR54), и клетки инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки центрифугировали при 2000 об./мин. при 4°C в течение 1 мин, супернатант отбрасывали, и клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS. Выявление проводили, используя BD

FACSVerse. Данные анализировали посредством Flowjo 7.6. Результаты исследования неспецифичной уничтожающей активности показаны на Фиг. 1.

Результаты показывают, что ADC-1 в настоящем изобретении оказывает явный неспецифичный эффект уничтожения, и ADC не уничтожают TROP-2-негативные MiaPaCa2 клетки, но ADC-1 также уничтожают TROP-2-негативные клетки, когда TROP-2-экспрессирующие клетки VxPC3 смешивают с негативными клетками MiaPaCa2.

Биологическая оценка активности *in vivo*

10 **Пример тестирования 7: Оценка эффективности *in vivo* на мышинной модели с ксенотрансплантатом, полученным из клеточной линии (CDX) Fadu**

Клетки Fadu (3×10^6) подкожно инокулировали в правую боковую поверхность голых мышей Balb/c, после 10 суток инокуляции, голых мышей с тяжелым весом, слишком большой опухолью и слишком маленькой опухолью удаляли после того, как объем опухоли составлял примерно 245 мм^3 , и оставшихся мышей случайным образом разделяли на 5 групп из 8 мышей в соответствии с объемом опухоли.

15 Каждой мышши внутрибрюшинно инъецировали ADC в количестве 0,1 мл/10 г массы тела в сутки 0 и 8, что составляло в общей сложности 2 инъекции с дозой 1 мг/кг. Объемы опухоли и массы тела измеряли дважды в неделю, и результаты записывали в течение 21 суток.

20 Данные записывали, используя программное обеспечение для статистического анализа Excel: средние значения рассчитывали в виде avg; значения SD рассчитывали в виде STDEV; значения SEM рассчитывали в виде STDEV/SQRT (число животных на группу); программное обеспечение GraphPad использовали для построения кривых, и статистический анализ данных проводили, используя двухфакторный или однофакторный дисперсионный анализ.

Объем опухоли (V) рассчитывали следующим образом: $V = 1/2 \times L_{\text{по длинной оси}} \times L_{\text{по короткой оси}}^2$

30 Относительная скорость пролиферации опухоли $T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$, где T и C представляют собой объемы опухоли животных в конце эксперимента в группе, получавшей лечение и контрольной группе, соответственно; T_0 и C_0 представляют собой объемы опухоли животных в начале эксперимента в группе, получавшей лечение и контрольной группе, соответственно.

Степень ингибирования роста опухоли: $TGI (\%) = 1 - T/C (\%)$.

Результаты показаны в Таблице 8, которая указывает на то, что ADC-1 оказывает сильный эффект ингибирования опухоли на ксенотрансплантатных опухолях FaDu в дозе 1 мг/кг массы тела.

5 Таблица 8. Эффективность ADC на ксенотрансплантатных опухолях FaDu голых мышей, несущих опухоль

Группа	Средний объем опухоли (мм ³)		Средний объем опухоли (мм ³)		Степень ингибирования роста опухоли, TGI (%)
	D0	SEM	D21	SEM	
Холостой контроль	246,8	29,04	2245,04	275,14	н.д.
ADC-4 1 мг/кг	244,41	29,62	1180,96	193,55	53
ADC-1 1 мг/кг	251,19	23,45	238,54	107,62	101
ADC-2 1 мг/кг	270,48	21,36	0	0	114
PD3 30 мг/кг	246,02	25	2407,37	207,71	-8

Пример тестирования 8: Оценка эффективности *in vivo* на мышинной модели с CDX клеток SKOV3

10 Клетки SKOV3 (5×10⁶) подкожно инокулировали в правую боковую поверхность голых мышей Balb/c, после 23 суток инокуляции, голых мышей с тяжелым весом, слишком большой опухолью и слишком маленькой опухолью удаляли после того, как объем опухоли составлял примерно 180 мм³, и оставшихся мышей случайным образом делили на 5 групп из 8 мышей в соответствии с
15 объемом опухоли.

Каждой мышке внутрибрюшинно инъецировали ADC в количестве 0,1 мл/10 г массы тела в общей сложности за 2 инъекции, и доза показана в следующей таблице. Объемы опухоли и массы тела измеряли два раза в неделю и результаты записывали. Данные записывали, используя программное обеспечение для
20 статистического анализа Excel: средние значения рассчитывали как avg; значения SD рассчитывали как STDEV; значения SEM рассчитывали как STDEV/SQRT (число животных на группу); программное обеспечение GraphPad Prism использовали для построения кривых, и статистический анализ данных проводили, используя двухфакторный или однофакторный дисперсионный анализ.

25 Объем опухоли (V) рассчитывали следующим образом: $V = 1/2 \times L_{\text{по длинной оси}} \times L_{\text{по короткой оси}}^2$

Относительная скорость пролиферации опухоли T/C(%) = $(T - T_0)/(C - C_0) \times 100$, где T и C представляют собой объемы опухоли животных в конце эксперимента в группе, получавшей лечение и контрольной группе, соответственно; T₀ и C₀

представляют собой объемы опухоли животных в начале эксперимента в группе, получавшей лечение и контрольной группе, соответственно.

Степень ингибирования роста опухоли, TGI (%) = 1 – T/C (%).

5 Результаты показаны в Таблице 9, в которой показано, что ADC-1 обладает сильным эффектом ингибирования опухоли на ксенотрансплантатных опухолях SKOV3 в разных дозах, и данный эффект ингибирования опухоли является дозозависимым.

Эффект является дозозависимым.

10 Таблица 9. Эффективность ADC на ксенотрансплантатных опухолях SKOV3 голых мышей, несущих опухоль

Группа	Средний объем опухоли (мм ³)		Средний объем опухоли (мм ³)		Степень ингибирования роста опухоли TGI (%)
	D0	SEM	D21	SEM	
Холостой контроль	183,26	7,6	1081,36	132,88	н.д.
ADC-110мг/кг	185,48	9,62	302,93	39,34	87
ADC-1 3 мг/кг	185,09	10,07	519,9	38,93	63
ADC-1 1 мг/кг	183,29	8,87	795,34	124,81	32
ADC-4 10 мг/кг	183,83	8,9	938,99	148,98	16
ADC-4 3 мг/кг	184,17	8,2	873,38	50,84	23
ADC-4 1 мг/кг	185,17	8,38	1110,52	159,73	-3
PD3 30 мг/кг	182,85	8,38	1384,28	93,87	-34

Пример тестирования 9: *In vivo* оценка эффективности на мышинной модели с CDX клеток Colo205

15 Клетки Colo205 (5×10^6) подкожно инокулировали в правую боковую поверхность голых мышей Balb/c, после 10 суток инокуляции, голых мышей с тяжелым весом, слишком большой опухолью и слишком маленькой опухолью удаляли после того, как объем опухоли составлял примерно 245 мм³, и оставшихся мышей случайным образом распределяли по 6 группам из 8 мышей в соответствии с объемом опухоли.

20

Каждой мышце внутрибрюшинно инъецировали ADC в количестве 0,1 мл/10 г массы тела в сутки (D0) и сутки 10, что составляло в общей сложности 2 инъекции с дозой 10 мг/кг. Объемы опухоли и массы тела измеряли два раза в неделю, и результаты записывали в течение 28 суток (D28).

25 Данные записывали, используя программное обеспечение для статистического анализа Excel: средние значения рассчитывали в виде avg;

значения SD рассчитывали в виде STDEV; значения SEM рассчитывали в виде STDEV/SQRT (число животных на группу); программное обеспечение GraphPad Prism использовали для построения кривых, и статистический анализ данных проводили, используя двухфакторный или однофакторный дисперсионный анализ.

5 Объем опухоли (V) рассчитывали следующим образом: $V = 1/2 \times L_{\text{по длинной оси}} \times L_{\text{по короткой оси}}^2$

Относительная скорость пролиферации опухоли $T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$, где T и C представляют собой объемы опухоли животных в конце эксперимента в группе, получавшей лечение и контрольной группе, соответственно; T_0 и C_0 представляют собой объемы опухоли животных в начале эксперимента в группе, получавшей лечение и контрольной группе, соответственно.

Степень ингибирования роста опухоли, $TGI (\%) = 1 - T/C (\%)$.

15 Результаты показаны в Таблице 10, в которой показано, что ADC-9 и ADC-7, полученные в результате конъюгирования с соединением 9-A, оказывают сильный эффект ингибирования опухоли на ксенотрансплантатных опухолях Colo205 в дозе 1 мг/кг массы тела.

Таблица 10. Эффективность ADC на ксенотрансплантатных опухолях FaDu голых мышей, несущих опухоль

Группа	Средний объем опухоли (мм ³)		Средний объем опухоли (мм ³)		Степень ингибирования роста опухоли, TGI (%)
	D0	SEM	D28	SEM	
Холостой контроль	210,30	24,91	1355,56	117,46	н.д.
ADC-6 10 мг/кг	194,93	26,56	1344,84	95,93	0
ADC-7 10 мг/кг	194,64	21,03	35,13	12,80	113
ADC-8 10 мг/кг	199,09	23,41	475,66	175,24	76
ADC-9 10 мг/кг	206,70	21,21	99,86	32,55	109
ADC-4 10 мг/кг	201,52	27,85	513,83	118,53	73

20

Препарат

Оборудование, используемое в получении препарата, и способ определения и расчета результатов показаны ниже:

1) Размерно-эксклюзионная хроматография SEC:

25 Это способ анализа разделения растворенного вещества по относительному сходству между размером пор геля и размером молекулярного клубка полимера образца.

SEC, % (выраженное в процентах содержание мономера SEC) = $A_{\text{мономер}} / A_{\text{общ.}} \times 100\%$ ($A_{\text{мономер}}$ представляет площадь пика мономера главного пика в образце, и $A_{\text{общ.}}$ представляет сумму всех площадей пика).

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

2) Капиллярный гель-электрофорез R-CE:

Это способ движения геля в капилляре в качестве поддерживающей среды для электрофореза и проведения разделения в соответствии с молекулярной массой образца под определенным напряжением.

10 Выраженная в процентах чистота R-CE = $A_{\text{главный пик}} / A_{\text{общ.}} \times 100\%$ ($A_{\text{главный пик}}$ представляет площадь главного пика легкой цепи + площадь главного пика тяжелой цепи в образце, и $A_{\text{общ.}}$ представляет сумму всех площадей пиков).

Прибор для определения R-CE: Beckman model plus800

3) Измерение мутности:

15 Степень, до которой затрудняется прохождение света через слой воды, указывает на способность слоя воды рассеивать и поглощать свет. Это связано не только с содержанием взвешенного вещества, но также с гранулометрическим составом, размером и формой, а также эффективностью отражения от его поверхности. При сравнении значений поглощения одного и того же образца белка при одной и той же концентрации при одной и той же длине волны (в пределах ближней области ультрафиолетового излучения и видимой области), чем больше значение поглощения, чем выше уровень мутности, тем больше молекул белка в образце имеет тенденцию к агрегированию. Прибор для измерения представлял собой многофункциональный микропланшет-ридер (Molecular Devices M5). Образцы
20 в одном и том же объеме добавляли в 96-луночный планшет и считывали значения поглощения.

4) Определение осмотического давления:

Для определения осмотического давления используют способ определения осмотического давления по точке замерзания. Точку замерзания раствора определяют посредством использования высокочувствительного термочувствительного элемента на основе пропорциональной связи между значением понижения точки замерзания и молярной концентрацией раствора, и затем переводят в осмотическое давление через количество электричества. Производитель прибора: Loser, модель: OM815.

35 5) Определение концентрации белка:

В настоящем изобретении концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство выражена в концентрации белка, а именно, концентрации группировки антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство.

Поскольку токсин в конъюгате антитело-лекарственное средство поглощает свет при характеристической длине волны поглощения белка 280 нм и также при 370 нм, концентрацию белка рассчитывают по следующей формуле:

$$A_{280\text{нм}} = (C_{\text{лекарственное средство}} \times E_{\text{лекарственное средство}-280} + C_{\text{mAb}} \times E_{\text{mAb}-280}) \times l$$

$$A_{370\text{нм}} = C_{\text{лекарственное средство}} \times E_{\text{лекарственное средство}-370} \times l$$

$$\text{если } R = \frac{E_{\text{лекарственное средство}-370}}{E_{\text{лекарственное средство}-280}}$$

то есть:

$$C_{\text{mAb}} = \frac{R \times A_{280\text{нм}} - A_{370\text{нм}}}{R \times E_{\text{mAb}-280}}$$

В данной формуле $A_{280\text{нм}}$: среднее значение поглощения одной части раствора тестируемого образца при длине волны 280 нм, когда оптический путь составляет 1 см;

$A_{370\text{нм}}$: среднее значение поглощения одной части раствора тестируемого образца при длине волны 370 нм, когда оптический путь составляет 1 см;

$E_{\text{mAb}-280}$: массовый коэффициент экстинкции белка при длине волны 280 нм, составляющий $1,532 \text{ г}^{-1}\text{см}^{-1}\text{л}$;

$E_{\text{лекарственное средство}-280}$: массовый коэффициент экстинкции токсина при длине волны 280 нм, равный $5,17 \text{ г}^{-1}\text{см}^{-1}\text{л}$;

$E_{\text{лекарственное средство}-370}$: массовый коэффициент экстинкции токсина при длине волны 370 нм, равный $17,89 \text{ г}^{-1}\text{см}^{-1}\text{л}$;

R: отношение коэффициента экстинкции токсина при 370 нм к коэффициенту экстинкции токсина при 280 нм, составляющее 3,46;

C_{mAb} : концентрация белка, мг/мл;

l: длина оптического пути, см (в данном документе оптический путь составляет 1 см).

Если раствор тестируемого образца разведен, концентрация белка выглядит следующим образом: $C \text{ (мг/мл)} = C_{\text{mAb}} \times N$, и N представляет собой фактор разведения.

Прибор для определения концентрации белка: спектрофотометр для ультрафиолетовой и видимой областей спектра, модель: Nano Drop One.

Пример 1: Осуществление скрининга буферной системы и pH для препаратов антитела ADC против Trop2

Следующие буферы использовали для получения препаратов антитела ADC против Trop2, причем концентрация белка ADC-3 составляет 10-30 мг/мл.

5 Конкретный состав композиции выглядит следующим образом:

1) 10 mM лимонная кислота-цитрат натрия (сокращенно, CA), pH 5,0, при концентрации белка 20 мг/мл;

2) 10 mM CA, pH 5,5, при концентрации белка 20 мг/мл;

3) 10 mM CA, pH 6,0, при концентрации белка 20 мг/мл;

10 4) 10 mM CA, pH 6,5, при концентрации белка 20 мг/мл;

5) 10 mM янтарная кислота-сукцинат натрия (сокращенно, SA), pH 5,0, при концентрации белка 20 мг/мл;

6) 10 mM SA, pH 5,5, при концентрации белка 20 мг/мл;

7) 10 mM SA, pH 6,0, при концентрации белка 20 мг/мл;

15 8) 10 mM гистидин-гистидина гидрохлорид (сокращенно, His-HCl), pH 5,5, при концентрации белка 10 мг/мл;

9) 10 mM His-HCl, pH 5,5, при концентрации белка 20 мг/мл;

10) 10 mM His-HCl, pH 5,5, при концентрации белка 30 мг/мл;

11) 10 mM His-HCl, pH 6,0, при концентрации белка 20 мг/мл;

20 12) 10 mM His-HCl, pH 6,5, при концентрации белка 20 мг/мл;

Полученные препараты фильтровали в стерильных условиях и помещали в контейнеры, которые закупоривали и закрывали крышками. Исследовали стабильность образцов в условиях принудительной дегградации (высокая температура 40°C), и внешний вид, SEC и R-CE использовали в качестве
25 показателей оценивания для исследования стабильности данных препаратов. Результаты экспериментов показаны в Таблице 11.

При 40°C и M1, число частиц системы His-HCl было меньше, чем число частиц систем CA и SA в соответствии с контролем внешнего вида, чистота системы His была выше, чем чистота систем CA и SA при одном и том же значении pH и
30 одной и той же концентрации белка, и пик мономера SEC и значение уменьшения главного пика R-CE уменьшались вместе с возрастанием значения pH в одной и той же буферной системе. В 10 mM His системе, pH 5,5, имелось небольшое увеличение в полимерах SEC наряду с повышением концентрации белка, и отсутствовало значимое изменение в чистоте R-CE. В итоге, буферная система предпочтительно
35 представляет собой His-HCl, интервал pH предпочтительно составляет 5,5-6,5, и концентрация белка предпочтительно составляет 10 мг/мл - 30 мг/мл.

Таблица 11. Результаты экспериментов по осуществлению скрининга pH и буферных систем

№	Условия хранения	Внешний вид	SEC%			R-CE %	
			Полимер	Мономер	Δмономер	Главный пик	Δглавный пик
1	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		99,2	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	2,1	87,1	11,8	88,8	10,5
2	D0	Светлый и прозрачный	0,6	98,8		99,2	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	3,4	90,4	8,4	92,9	6,4
3	D0	Светлый и прозрачный	0,6	98,8		99,3	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	3,8	92,7	6,2	95,5	3,8
4	D0	Светлый и прозрачный	0,7	98,7		99,2	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	3,7	93,6	5,1	95,9	3,3
5	D0	Светлый и прозрачный	0,5	99,0		99,1	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	1,6	91,0	8,0	91,5	7,5
6	D0	Светлый и прозрачный	0,6	98,8		99,0	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с	2,8	92,5	6,3	93,9	5,1

№	Условия хранения	Внешний вид	SEC%			R-CE %	
		большим количеством частиц					
7	D0	Светлый и прозрачный	0,8	98,6		99,2	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	3,9	93,2	5,4	95,7	3,6
8	D0	Светлый и прозрачный	0,5	99,0		99,4	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	0,7	95,4	3,6	95,9	3,5
9	D0	Светлый и прозрачный	0,5	99,5		99,2	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	1,0	94,4	5,1	94,9	4,4
10	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		98,9	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	1,4	93,9	5,0	95,5	3,4
11	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		99,2	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	1,4	95,2	3,6	96,0	3,2
12	D0	Светлый и прозрачный	0,6	98,8		99,0	
	40°C M1	Слегка опалесцирующий, с большим количеством частиц	2,0	95,3	3,6	95,8	3,3

Примечание: D0 показывает начало эксперимента, «M» показывает месяц, например, M1 показывает один месяц; Δ значение показывает разницу между исследуемым показателем и D0 после хранения в каждом из условий, и те же обозначения используются ниже.

5

Пример 2: Скрининг поверхностно-активных веществ для препаратов антитела ADC против Trop2

Препараты антитела ADC против Trop2, содержащие 80 мг/мл сахарозы и полисорбат 80 (сокращенно, PS80) в разных концентрациях, с концентрацией белка ADC-3, составляющей 20 мг/мл, получали посредством использования 10 мМ буферной системы His-HCl, pH 6,0. Композиция конкретного состава выглядит следующим образом:

- 1) не содержит PS80;
- 2) 0,2 мг/мл PS80;
- 15 3) 0,4 мг/мл PS80;
- 4) 0,6 мг/мл PS80;

Полученные препараты фильтровали в стерильных условиях и помещали в контейнеры, которые закупоривали и закрывали крышками. Образцы подвергали встряхиванию (25°C, 300 об./мин., 3 суток) и в условиях высокой температуры (40°C M1), и внешний вид, SEC и R-CE использовали в качестве показателей оценивания для исследования стабильности данных препаратов. Результаты экспериментов показаны в Таблице 12.

Результаты экспериментов показывают, что внешний вид групп 0,2-0,6 мг/мл PS80 лучше, чем внешний вид группы, не содержащей PS80, во всех условиях исследования, и в случае чистоты R-CE, уменьшение в главном пике группы 0,2 мг/мл PS80 после 1 месяца высокой температуры было меньше, чем уменьшение в главном пике групп 0,4 мг/мл и 0,6 мг/мл. В итоге, концентрация PS80 предпочтительно составляет 0,2 мг/мл.

30 Таблица 12. Результаты экспериментов по осуществлению скрининга поверхностно-активных веществ для препаратов

№.	Условия хранения	Внешний вид	SEC %			R-CE%	
			Полимер	Мономер	Δмономер	Главный пик	Δглавный пик
1	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		99,3	
	Встряхивание	Слегка опалесцирующий,	0,6	98,9	0,1	99,2	0,0

	при 25°C, D3	с большим количеством частиц					
	40°C M1	Маленькое количество частиц	0,8	95,2	3,8	95,9	3,4
2	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		98,5	
	Встряхивание при 25°C, D3	Слегка опалесцирующий	0,5	99,0	0,0	98,2	0,3
	40°C M1	Слегка опалесцирующий	1,0	94,7	4,2	95,2	3,3
3	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		99,2	
	Встряхивание при 25°C, D3	Слегка опалесцирующий	0,5	99,0	-0,1	99,0	0,2
	40°C M1	Слегка опалесцирующий	1,1	94,8	4,1	93,2	6,0
4	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		99,0	
	Встряхивание при 25°C, D3	Слегка опалесцирующий	0,5	99,0	-0,1	99,1	-0,1
	40°C M1	Слегка опалесцирующий	1,0	95,3	3,6	94,0	5,0

Пример 3: Осуществление скрининга сахаридов для препаратов антител ADC против Trop2

5 Препараты антител ADC против Trop2, содержащие 0,4 мг/мл полисорбата 80 и разные типы сахаридов с концентрацией белка ADC-3, составляющей 20 мг/мл, получали посредством использования 10 мМ буферной системы His-HCl, pH 6,0. Разные сахариды выглядят следующим образом, и содержание сахаридов представляет собой концентрацию, когда осмотическое давление раствора является изотоническим:

- 10 1) 80 мг/мл сахарозы;
2) 88 мг/мл дигидрата трегалозы;

Полученные препараты фильтровали в стерильных условиях и помещали в контейнеры, которые закупоривали и закрывали крышками. Образцы подвергали встряхиванию (25°C, 300 об./мин., 3 суток), FT5C (5 циклов замораживания-размораживания между -35°C и 2-8°C), и условиям высокой температуры (40°C M1), и внешний вид, SEC и R-CE использовали в качестве показателей оценки для

15

исследования стабильности данных препаратов. Результаты экспериментов показаны в Таблице 13.

Результаты экспериментов показывают, что внешний вид и чистота препаратов, содержащих сахарозу и трегалозы дигидрат, не демонстрировали значимого различия в разных условиях.

Таблица 13. Результаты экспериментов по осуществлению скрининга сахаридов

№	Условия хранения	Внешний вид	SEC%			R-CE%	
			Полимер	Мономер	Δмономер	Главный пик	Δглавный пик
1	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		99,2	
	Встряхивание при 25°C, D3	Слегка опалесцирующий	0,5	99,0	-0,1	99,0	0,2
	FT5C	Слегка опалесцирующий	0,5	99,0	-0,1	97,9	1,3
	40°C M1	Слегка опалесцирующий	1,1	94,8	4,1	93,2	6,0
2	D0	Светлый и прозрачный	0,5	98,9		99,1	
	Встряхивание при 25°C, D3	Слегка опалесцирующий	0,5	99,0	0,0	98,3	0,8
	FT5C	Слегка опалесцирующий	0,5	99,1	-0,1	98,1	1,0
	40°C M1	Слегка опалесцирующий	1,1	95,0	4,0	93,7	5,4

10

Пример 4: Оптимизация состава препаратов антитела ADC против Trop2

15 Препараты антитела ADC против Trop2, содержащие 0,2 мг/мл PS80, сахарозу в разных концентрациях и глицин в разных концентрациях, с концентрацией белка ADC-3, составляющей 20 мг/мл, получали посредством использования буферной системы His-HCl, pH 6,0. Композиция конкретного состава выглядит следующим образом:

- 1) 10 mM His-HCl pH 6,0, 80 мг/мл сахарозы;
- 2) 10 mM His-HCl pH 6,0, 40 мг/мл сахарозы, 10,2 мг/мл глицина;
- 3) 30 mM His-HCl pH 6,0, 70 мг/мл сахарозы;

4) 30 мМ His-HCl pH 6,0, 40 мг/мл сахарозы, 7,6 мг/мл глицина;

Два способа изготовления, то есть раствор и лиофилизированный препарат, использовали для исследования.

5 Растворы: полученные препараты фильтровали в стерильных условиях и помещали в контейнеры, которые закупоривали и закрывали крышкой. Растворы подвергали воздействию условий высокой температуры (40°C D10), и SEC и R-CE использовали в качестве показателей оценки для исследования стабильности препаратов. Результаты экспериментов показаны в Таблице 14. Отсутствовало значимое различие в чистоте после хранения в условиях при 40°C D10 для всех групп.

Таблица 14. Результаты экспериментов по осуществлению скрининга регуляторов осмотического давления для препаратов

№	Условия хранения	Внешний вид	SEC %			R-CE%	
			Полимер	Мономер	Δмономер	Главный пик	Δглавный пик
1	D0	Светлый и прозрачный	2,3	97,2	н.д.	98,7	н.д.
	40°C D10	Светлый и прозрачный	2,1	94,1	3,1	98,1	0,6
2	D0	Светлый и прозрачный	2,2	97,2	н.д.	98,7	н.д.
	40°C D10	Светлый и прозрачный	2,1	94,2	3,0	98,0	0,7
3	D0	Светлый и прозрачный	2,4	97,1	н.д.	98,9	н.д.
	40°C D10	Светлый и прозрачный	2,4	93,8	3,3	98,2	0,7
4	D0	Светлый и прозрачный	2,4	97,0	н.д.	98,9	н.д.
	40°C D10	Светлый и прозрачный	2,5	93,6	3,5	98,2	0,7

15 Примечание: в данной таблице, «D» показывает сутки; например, D10 показывает 10 суток.

20 Лиофилизированный препарат: полученные препараты фильтровали в стерильных условиях, помещали в контейнеры, неполностью закупоривали, лиофилизировали, закупоривали и закрывали крышкой. Исследовали внешний вид и восстановление лиофилизированных продуктов. Способ лиофилизации выглядел следующим образом:

Таблица 15. Способ лиофилизации

Параметр процесса лиофилизации	Установленная температура (°С)	Установленное время (мин)	Время удерживания (мин)	Степень вакуума (Па)
Предварительное замораживание	5	10	60	н.д.
Предварительное замораживание	-45	50	120	н.д.
Первичная сушка	-20	120	3000	10
Вторичная сушка	25	60	1	10
	25	1	600	1

Результаты:

Внешний вид лиофилизированного порошкообразного осадка показывал, что осадок группы с высокой концентрацией сахарозы был слегка сжат, и когда концентрация сахарозы была уменьшена до 40 мг/мл и добавляли глицин, порошкообразный осадок, полученный в тех же условиях лиофилизации, был однородным, полным и без разрушений, что указывает на то, что период времени первичной сушки, требуемый, когда концентрация сахарозы была уменьшена и был добавлен глицин, был короче, чем период времени первичной сушки, требуемый для препаратов с высокой концентрацией сахарозы.

Когда концентрация сахарозы составляла 40 мг/мл, образцы, полученные с использованием буферов в разных концентрациях, были однородными, полными и без разрушений во внешнем виде после процесса лиофилизации.

Таблица 16. Результаты лиофилизированных препаратов в осуществлении скрининга регуляторов осмотического давления

№	Осмотическое давление (мОсм)	Внешний вид после лиофилизации	Условия восстановления
1	289	Легкое сжатие края на нижней части	Легко восстановить
2	287	Белый однородный осадок	Легко восстановить
3	279	Легкое сжатие края на нижней части	Легко восстановить
4	279	Белый однородный осадок	Легко восстановить

Пример 5: Тестирование стабильности препаратов антитела ADC против Trop2

Препарат ADC против Trop2, содержащий 40 мг/мл сахарозы, 9,0 мг/мл глицина и 0,2 мг/мл PS80 с концентрацией белка ADC-3, равной 20 мг/мл, получали посредством использования 30 мМ буферной системы His-HCl, pH 6,0.

Полученный препарат фильтровали в стерильных условиях и помещали в контейнеры, которые закупоривали и закрывали крышками. Образцы подвергали воздействию условий встряхивания усиленной деградации (25°C, 300 об./мин., 10 суток), FT5C (5 циклов замораживания-оттаивания между -35°C и 2-8°C) и высокой температуры (40°C M1), ускорения при 25°C (25°C M3) и условий долгосрочного хранения при 2-8°C (4°C M3), и внешний вид, SEC и R-CE использовали в качестве показателей оценки для исследования стабильности препаратов. Результаты экспериментов показаны в Таблице 17.

Результаты экспериментов показывают, что внешний вид препарата конечного состава был осветленным и прозрачным во всех условиях усиленной деградации, и препарат конечного состава обладает хорошей стабильностью.

Таблица 17. Данные по тестированию стабильности

Условия хранения	Внешний вид	SEC %		R-CE%	
		Мономер	Δмономер	Главный пик	Δглавный пик
D0	Светлый и прозрачный	97,9	н.д.	98,8	н.д.
Встряхивание в течение 10 суток	Светлый и прозрачный	97,6	0,2	99,3	-0,5
FT5C	Светлый и прозрачный	97,6	0,3	99,3	-0,5
40°C D16	Светлый и прозрачный	95,8	2,1	95,9	2,9
25°C M3	Светлый и прозрачный	94,4	3,5	96,6	2,3
4°C M3	Светлый и прозрачный	97,4	0,5	98,2	0,6

15 Пример 6: Лиофилизация препарата антитела ADC против Trop2

15 Препарат антитела ADC против Trop2, содержащий 40 мг/мл сахарозы, 9 мг/мл глицина и 0,2 мг/мл PS80, с концентрацией белка ADC-3, составляющей 20 мг/мл, получали в 30 mM буфере His-HCl, pH 6,0, и образец препарата лиофилизировали посредством использования способа лиофилизации, включающего предварительное замораживание, первичную сушку и вторичную сушку, как показано в Таблице 18. После завершения способа лиофилизации, выполняли закупоривание в вакууме. Лиофилизированный образец внешне представлял собой белый однородный осадок, удовлетворял стандартам с точки зрения влагосодержания и легко восстанавливался, и он удовлетворял стандартам

в отношении SEC и чистоты NR-CE после восстановления. Результаты показаны в Таблице 19. pH после восстановления составлял 6,1.

Таблица 18. Способ лиофилизации

Параметр процесса лиофилизации	Установленная температура (°C)	Установленное время (мин)	Время удерживания (мин)	Степень вакуума (Па)
Предварительное замораживание	5	10	60	н.д.
Первичная сушка	-10	120	3000	10
Вторичная сушка	25	60	1	10
	25	1	600	1

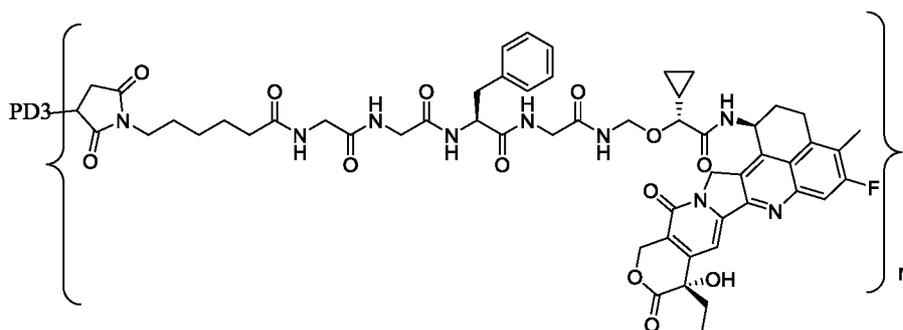
5

Таблица 19. Данные по лиофилизированному продукту

Внешний вид продукта	Влагосодержание	Время удерживания	SEC% (мономер)	NR-CE% (главный пик)
Белый однородный осадок	0,8%	1 мин	97,7%	97,2%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство и буфер, где указанный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, представленную ниже:



где:

PD3 представляет собой антитело против TROP2, содержащее тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 2;

n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 8;

буфер фармацевтической композиции представляет собой буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина с pH от примерно 5,0 до примерно 6,5, предпочтительно с pH от примерно 5,5 до примерно 6,5 и более предпочтительно с pH от примерно 5,9 до примерно 6,2.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой буфер находится в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ, предпочтительно от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ, и более предпочтительно примерно 30 мМ.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, причем указанное поверхностно-активное вещество предпочтительно представляет собой полисорбат, более предпочтительно полисорбат 80 или полисорбат 20, и наиболее предпочтительно полисорбат 80.

4. Фармацевтическая композиция по п. 3, в которой поверхностно-активное вещество находится в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл,

предпочтительно от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл, и более предпочтительно примерно 0,2 мг/мл.

5. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-4, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит сахарид, причем указанный сахарид предпочтительно выбран из группы, состоящей из сахарозы и дигидрата трегалозы, и наиболее предпочтительно представляет собой сахарозу.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5, в которой сахарид находится в концентрации от примерно 25 мг/мл до примерно 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 мг/мл до примерно 50 мг/мл, и более предпочтительно примерно 40 мг/мл.

7. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-6, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит аминокислоту или соль аминокислоты, при этом указанная аминокислота или соль аминокислоты предпочтительно выбрана из группы, состоящей из глицина и гидрохлорида аргинина, и более предпочтительно представляет собой глицин.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой глицин находится в концентрации от примерно 6 мг/мл до примерно 15 мг/мл, предпочтительно от примерно 7 мг/мл до примерно 11 мг/мл, и более предпочтительно примерно 9 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-8, в которой конъюгат антитело-лекарственное средство имеет концентрацию белка от 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл, от примерно 10 мг/мл до примерно 30 мг/мл или от примерно 18 мг/мл до примерно 22 мг/мл.

10. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-9, содержащая следующие компоненты:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации белка от примерно 10 мг/мл до примерно 30 мг/мл, (b) от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл полисорбата, (c) от примерно 30 мг/мл до примерно 50 мг/мл сахарозы, (d) от примерно 7 мг/мл до примерно 11 мг/мл глицина, и (e) от примерно 20 мМ до

примерно 40 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, причем композиция имеет рН примерно от 5,5 до 6,5;

где предпочтительно указанная фармацевтическая композиция содержит следующие компоненты:

а) конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации белка от примерно 18 мг/мл до примерно 22 мг/мл, (b) примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 40 мг/мл сахарозы, (d) примерно 9 мг/мл глицина и (e) примерно 30 мМ буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, причем указанная композиция имеет рН примерно от 5,9 до 6,2.

11. Лиофилизированный препарат, содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство, где указанный лиофилизированный препарат может быть восстановлен с образованием фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-10.

12. Способ получения лиофилизированного препарата, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий стадию лиофилизации фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-10.

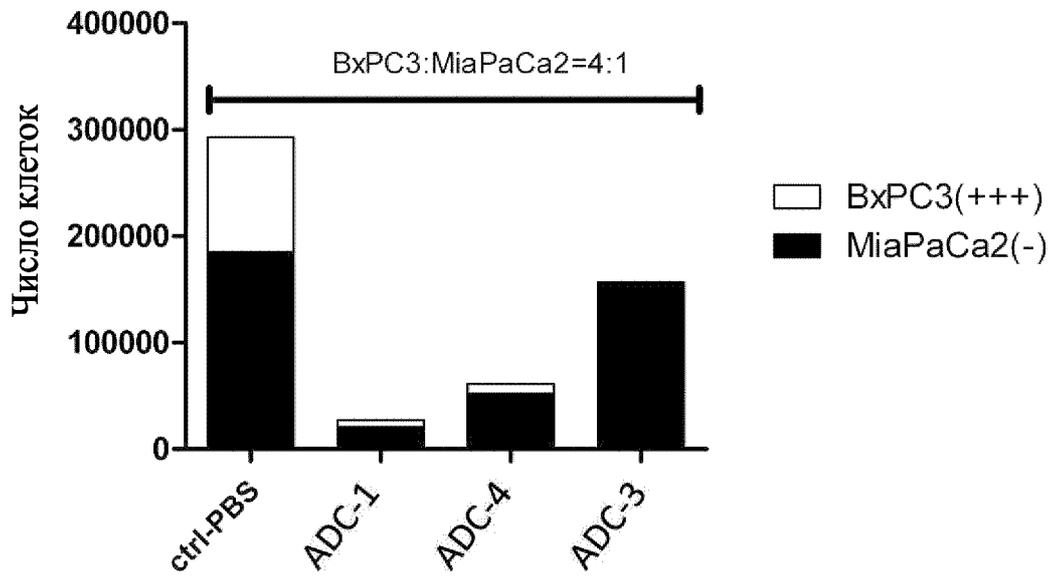
13. Лиофилизированный препарат, содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство, где указанный лиофилизированный препарат получен посредством лиофилизации фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-10.

14. Восстановленный раствор, содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство, где указанный восстановленный раствор получен посредством восстановления лиофилизированного препарата по п. 11 или п. 13.

15. Изделие, содержащее контейнер, где указанный контейнер содержит фармацевтическую композицию по любому из п.п. 1-10, лиофилизированный препарат по п. 11 или п. 13 или восстановленный раствор по п. 14.

16. Применение фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-10, лиофилизированного препарата по п. 11 или п. 13, восстановленного раствора по п. 14 или изделия по п. 15 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, опосредованного TROP-2.

17. Применение фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-10, лиофилизированного препарата по п. 11 или п. 13, восстановленного раствора по п. 14 или изделия по п. 15 для получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения опухоли и рака, где указанная опухоль и указанный рак предпочтительно представляют собой плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак головы и шеи, рак головного мозга, нейроглиому, мультиформную глиобластому, нейробластому, карциному центральной нервной системы, нейроэндокринную опухоль, рак горла, фарингеальную плоскоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному ротовой полости, назофарингеальный рак, рак пищевода, рак щитовидной железы, злокачественную мезотелиому плевры, рак легкого, рак молочной железы, рак печени, рак гепатобилиарной системы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак почки, светлоклеточную карциному почки, рак яичника, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак яичка, рак кожи, меланому, лейкоз, лимфому, рак кости, хондросаркому, миелому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, опухоль Крукенберга, миелопролиферативную опухоль, плоскоклеточную карциному, саркому Юинга, уротелиальную карциному и клеточную карциному Меркеля; более предпочтительно, лимфома выбрана из группы, состоящей из лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, Т-клеточной/богатой гистиоцитами крупноклеточной В-клеточной лимфомы и лимфоплазмоцитарной лимфомы; рак легкого выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого; лейкоз выбран из группы, состоящей из хронического миелоидного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лимфобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза и миелоидного лейкоза.



ФИГ. 1