

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490743 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.24(51) Int. Cl. A61K 47/68 (2017.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.09.16

(54) СОСТАВ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(86) PCT/CN2021/118656

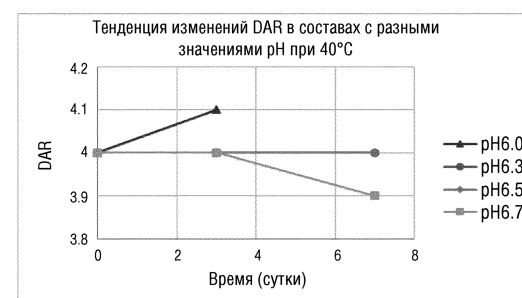
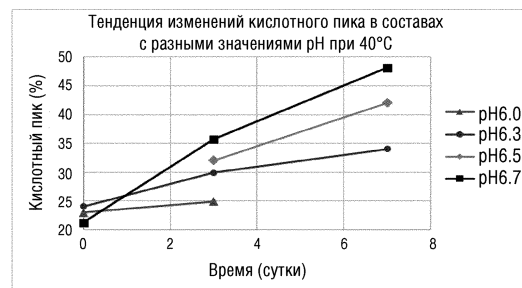
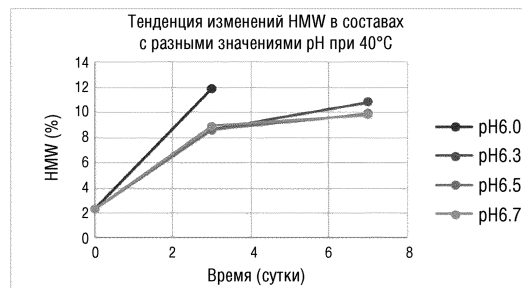
(72) Изобретатель:

(87) WO 2023/039778 2023.03.23

Сяо Лили, Ху Чаохун (CN)

(71) Заявитель:
ШАНХАЙ МИРАКОДЖЕН ИНК.
(CN)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к составу конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство или его соль, буферный раствор лимонной кислоты, трегалозу, хлорид натрия и полисорбат 80. Конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, соответствующую $Ab-(L-D)_p$, где Ab обозначает антитело против рецептора эпидермального фактора роста, L обозначает линкер и D обозначает цитотоксическое средство.



A1

202490743

202490743

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580910EA/042

СОСТАВ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Область изобретения

[001] Настоящее изобретение относится к области биомедицины, в частности, к составу конъюгата антитело-лекарственное средство и его применению.

Уровень техники изобретения

[002] Рецептор эпидермального фактора роста рецептор (EGFR, также известный как HER1, c-ErbB1) представляет собой рецептор семейства эпидермального фактора роста на клеточной поверхности, является трансмембранным гликопротеином, состоящим из 1186 аминокислотных остатков, и имеет молекулярную массу 170 кДа. EGFR принадлежит подсемейству типа I тирозинкиназных рецепторов ErbB (ErbB 1-4) и обладает тирозинкиназной активностью. EGFR стабильно экспрессируется во многих эпителиальных тканях, включая кожу и волосные фолликулы. Аномальная экспрессия или активация рецептора эпидермального фактора роста, вызываемая мутацией рецептора, может приводить к канцерогенезу. Существует множество солидных опухолей, в которых происходит сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста, таких как рак ободочной и прямой кишки, рак головы и шеи, рак легкого, рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря и рак пищевода. Эндогенными лигандами для EGFR являются факторы роста, такие как трансформирующий фактор роста α и эпидермальный фактор роста. Эти лиганды связываются с рецептором эпидермального фактора роста, повышают активность внутриклеточной тирозинпротеинкиназы и инициируют множество нижеследующих каскадов передачи сигнала, тем самым регулируя рост и дифференцировку нормальных клеток, повышая инвазивность опухолевых клеток, способствуя ангиогенезу и ингибируя апоптоз опухолевых клеток. Сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста в опухоли и ее важные роли в росте и дифференцировке опухолевых клеток делают рецептор эпидермального фактора роста перспективной мишенью для терапии опухоли.

[003] В настоящее время на рынке присутствует два антитела против рецептора эпидермального фактора роста, один из которых представляет собой химерное антитело человека-мыши С225 (Эрбитукс или Цетуксимаб, ImClone Company (теперь Eli Lilly Company)), который обладает аффинностью специфического связывания с рецептором эпидермального фактора роста, может блокировать связывание между лигандом, таким как EGF или TGF, и рецептором эпидермального фактора роста, и ингибировать его фосфорилирование и нижеследующую передачу сигнала, тем самым ингибируя рост опухолевых клеток, индуцируя апоптоз, снижая продуцирование матриксных металлопротеиназ и сосудисто-эндотелиального фактора роста. FDA США одобрило применение Эрбитукса для лечения рака ободочной и прямой кишки в 2004 году, для лечения рака головы и шеи в 2006 году и для других онкологических показаний, в

настоящее время проходящих дополнительные клинические испытания. Клинически, общая частота ответа (ORR) комбинации Эрбитукса и иринотекана при лечении рака ободочной и прямой кишки составляет 23%, и ORR комбинации Эрбитукса и химиотерапевтического лекарственного средства, такого как фторпиримидин, при лечении рака головы и шеи составляет 13%-30%. Поскольку Эрбитукс является химерным антителом человека-мыши, он в клиническом испытании индуцировал ответ против терапевтических антител у 3,7% пациентов.

[004] Другим антителом против рецептора эпидермального фактора роста является панитумумаб (Вектибикс, Amgen Company), который является полностью гуманизированным моноклональным антителом, полученным с использованием технологии трансгенных мышей, и является свободным от оригинальной белковой последовательности мыши. Антитело нацелено на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и было одобрено FDA в сентябре 2006 года для применения в комбинации с фторпиримидином, Оксалиплатином и Иринотеканом или для лечения EGFR-положительного метастазирующего рака ободочной и прямой кишки после химиотерапии. В 2006 году FDA одобрило его монотерапию для лечения метастазирующего рака ободочной и прямой кишки (mCRC) с толерантностью к химиотерапии. Однако, панитумумаб является антителом подтипа IgG2 и, по сравнению с IgG1, IgG2, демонстрирует значительно сниженную биологическую активность, такую как активность CDC и активность ADCC; кроме того, антитела подтипа IgG2 обычно имеют низкую стабильность. Это может быть основными причинами, почему полностью гуманизированное антитело панитумумаб демонстрирует отсутствие очевидных преимуществ клинических эффектов по сравнению с химерным антителом Эрбитуксом. Частота общей выживаемости (OR) при клиническом лечении рака ободочной и прямой кишки составила только 8% и выживаемость без прогрессирования продлевалась только на 3,6 месяца.

[005] В настоящее время большое количество клинических данных показало, что Эрбитукс и панитумумаб имел терапевтические эффекты только на имеющий дикий тип KRAS (KRAS дикого типа) с экспрессией EGFR, но не имел активности ингибирования роста опухоли в отношении мутантов KRAS. Таким образом, в руководстве, опубликованном Американским сообществом клинической онкологии, прямо указывается, что лекарственные средства на основе моноклональных антител против EGFR применимы только для пациентов с раком ободочной и прямой кишки пациенты с KRAS дикого типа (Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor monoclonal antibody therapy. J. Clin Oncol. 2009; 27:2091-2096; Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2010; 28:1254-1261).

[006] Таким образом, в данной области существует необходимость в

лекарственных средствах на основе гуманизированных антител против рецептора эпидермального фактора роста с биологической активностью, особенно в антительных лекарственных средствах, таких как конъюгаты антитело-лекарственное средство с эффектом излечения в случае мутантов KRAS, для дальнейшего повышения терапевтической эффективности и снижения побочных эффектов.

Сущность изобретения

[007] Путем тщательных экспериментов и творческих усилий авторы изобретения настоящей заявки предоставили состав конъюгата антитело против EGFR-лекарственное средство, который обладает хорошим терапевтическим эффектом на заболевания, связанные с EGFR, и, по сравнению с уровнем техники, стабильность состава значительно увеличена.

[008] Ввиду этого, в первом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится составу конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство или его соль в концентрации 1-20 мг/мл (такой как 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 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 или 20 мг/мл, или 3-5 мг/мл, или 2-6 мг/мл, или 1-7 мг/мл, или 1-8 мг/мл, или 1-9 мг/мл, или 1-10 мг/мл);

[009] цитратный буфер в концентрации 10-50 мМ (такой как 10 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ, или 19-21 мМ, или 18-22 мМ, или 17-23 мМ, или 16-24 мМ) и с pH 6,3-6,7 (таким как 6,3, 6,4, 6,5, 6,6 или 6,7);

[0010] трегалозу в концентрации 1-10% (такой как 1%, 2%, 3%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 8%, 9% или 10%, или 4-7%, или 4,5-6,5%, или 5-6%);

[0011] NaCl в концентрации 0,1-2% (такой как 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5% или 2%, или 0,2-0,4%); и

[0012] Tween 80 в концентрации 0,01-0,2% (такой как 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,15% или 0,2%, или 0,02-0,08%, или 0,03-0,07%, или 0,04-0,06%);

[0013] где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы I,

$Ab-(L-D)_p$

формула I

[0014] где:

[0015] Ab обозначает антитело против EGFR, где антитело против EGFR содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где CDR1, CDR2 и CDR3 в варибельной области тяжелой цепи, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 5-7, или их мутанты, и CDR1, CDR2 и CDR3 в варибельной области легкой цепи, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 12-14, или их мутанты;

[0016] L обозначает линкер, и линкер представляет собой б-малеимидокапроил-

валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (МС-vc-РАВ);

[0017] D обозначает цитотоксическое средство, и цитотоксическое средство представляет собой ММАЕ; и

[0018] p обозначает 1-9 (как например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, или, например, 1-7), как например, 2-6, 3-5, в частности, например, 3,9, 4,0 или 4,1.

[0019] Следует отметить, что концентрация трегалозы, NaCl или Tween 80 соответствует концентрации массы по объему (масс./об.%), которая относится к массе (единица: г) трегалозы, хлорида натрия или Tween 80 на 100 мл состава конъюгата антитело-лекарственное средство.

[0020] Кроме того, "цитратный буфер" получают из лимонной кислоты и цитрата натрия, и его разные значения pH достигаются путем подбора разных соотношений лимонной кислоты и цитрата натрия. Концентрация "цитратного буфера" относится к общей концентрации лимонной кислоты и цитрата натрия.

[0021] Кроме того, следует отметить, что "конъюгат антитело-лекарственное средство", описанный выше, относится к композиции, содержащей молекулы ADC с одинаковым или разным DAR.

[0022] В частности, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей множество молекул ADC против EGFR. В некоторых случаях все ADC в композиции, описанной в настоящем описании, содержат одинаковое количество одного или нескольких цитотоксических средств. В других случаях каждый ADC в композиции, описанной в настоящем описании, содержит отличающееся количество одного или нескольких цитотоксических средств.

[0023] В конъюгате антитело-лекарственное средство, описанном в настоящем описании, каждое антитело против EGFR может быть конъюгировано с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более цитотоксических средств.

[0024] Соотношение лекарственного средства и антитела (DAR), упоминаемое выше, относится к количеству молекул цитотоксического средства, конъюгированного с антителами против EGFR. Количество молекул цитотоксического средства, содержащегося в ADC, описанном в настоящем описании, как правило, представляет собой целое число, когда количество (например, p в формуле I) молекул цитотоксического средства, содержащихся в ADC, описанном в настоящем описании, представляет собой дробное число, это дробное число относится к среднему количеству цитотоксических средств, конъюгированных с каждым антителом против EGFR, в композиции, содержащей множество молекул ADC.

[0025] В некоторых вариантах осуществления концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство или его соли составляет 2 мг/мл-6 мг/мл.

[0026] В некоторых вариантах осуществления концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство или его соли составляет 4 мг/мл.

[0027] В некоторых вариантах осуществления концентрация цитратного буфера составляет 15 мМ-25 мМ.

[0028] В некоторых вариантах осуществления концентрация цитратного буфера составляет 20 мМ.

[0029] В некоторых вариантах осуществления рН цитратного буфера составляет 6,3-6,5.

[0030] В некоторых вариантах осуществления рН цитратного буфера составляет 6,3.

[0031] В некоторых вариантах осуществления концентрация трегалозы составляет 4%-7%.

[0032] В некоторых вариантах осуществления концентрация трегалозы составляет 5,5%.

[0033] В некоторых вариантах осуществления концентрация NaCl составляет 0,1%-0,5%.

[0034] В некоторых вариантах осуществления концентрация NaCl составляет 0,3%.

[0035] В некоторых вариантах осуществления концентрация Tween 80 составляет 0,01%-0,1%.

[0036] В некоторых вариантах осуществления концентрация Tween 80 составляет 0,05%.

[0037] В некоторых вариантах осуществления области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариательной области тяжелой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 8-11, или их мутанты.

[0038] В некоторых вариантах осуществления области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариательной области легкой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 15-18, или их мутанты.

[0039] В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей IgG, IgM, IgA, IgD и IgA человека или их мутантов.

[0040] В некоторых вариантах осуществления IgG выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0041] В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей лямбда и каппа человека или их мутантов.

[0042] В некоторых вариантах осуществления последовательность вариательной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 1, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 1.

[0043] В некоторых вариантах осуществления последовательность вариательной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 1.

[0044] В некоторых вариантах осуществления последовательность вариательной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано

под SEQ ID NO: 2, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 2.

[0045] В некоторых вариантах осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 2.

[0046] В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 3, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 3.

[0047] В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 3.

[0048] В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 4, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 4.

[0049] В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 4.

[0050] В некоторых вариантах осуществления трегалоза представляет собой дигидрат трегалозы.

[0051] В некоторых вариантах осуществления цитратный буфер получают из лимонной кислоты и цитрата натрия.

[0052] В некоторых вариантах осуществления лимонная кислота представляет собой моногидрат лимонной кислоты.

[0053] В некоторых вариантах осуществления цитрат натрия представляет собой дигидрат цитрата натрия.

[0054] Во втором аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу получения состава, описанного выше, включающему:

1) позволение антителу против EGFR, как описано выше, подвергаться реакции восстановления с восстановителем с получением восстановленного антитела против EGFR;

2) позволение восстановленному антителу против EGFR подвергаться реакции конъюгации с vсММАЕ; и

3) гашение реакции конъюгации и проведение замены буфера в продукте реакции конъюгации с получением состава конъюгата антитело-лекарственное средство, как описано выше.

[0055] В некоторых вариантах осуществления способ включает:

(1) замену в антителе против EGFR, описанном выше (предпочтительно 10 мг) (предпочтительно три раза) на буфер для восстановления (предпочтительно содержащий:

25 мМ борат натрия, рН 8,0, 25 мМ NaCl, 5 мМ EDTA), детекцию концентрации белка и вычисление количества белка;

(2) добавление DTT к продукту стадии (1) для реакции при комнатной температуре в течение 1-5 ч (предпочтительно 2 ч) с получением восстановленного антитела против EGFR, где количество вещества DTT в 2,0-3,0 раза, предпочтительно в 2,5 раза, превышает количество вещества белка;

(3) замену в продукте стадии (2) (предпочтительно три раза) на буфер для присоединения (предпочтительно содержащий: 50 мМ Tris, рН7,2, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA), и вычисление количества вещества свободных тиольных групп;

(4) добавление *vc*-ММАЕ (т.е. MC-*vc*-РАВ-ММАЕ) к продукту стадии (3) для реакции при комнатной температуре в течение 1-5 ч (предпочтительно 2 ч), где количество вещества *vc*-ММАЕ в 1,0-1,5 раза, предпочтительно в 1,1 раза, превышает количество вещества восстановленного антитела против EGFR;

(5) добавление N-ацетилцистеина к продукту стадии (4) и позволение стоять (предпочтительно в течение 5 мин) с получением смешанного раствора, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство, описанный выше, где количество вещества N-ацетилцистеина в 15-25 раз, предпочтительно в 20 раз, превышает количество вещества *vc*-ММАЕ; и

(6) замену в смешанном растворе стадии (5) (предпочтительно три раза) на исходный раствор для конъюгации с получением состава конъюгата антитело-лекарственное средство;

причем исходный раствор для конъюгации содержит:

цитратный буфер в концентрации 10-50 мМ (такой как 10 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ, или 19-21 мМ, или 18-22 мМ, или 17-23 мМ, или 16-24 мМ) и рН 6,3-6,7 (таким как 6,3, 6,4, 6,5, 6,6 или 6,7);

трегалозу в концентрации 1-10% (такой как 1%, 2%, 3%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 8%, 9% или 10%, или 4-7%, или 4,5-6,5%, или 5-6%);

NaCl в концентрации 0,1-2% (такой как 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5% или 2%, или 0,2-0,4%); и

Tween 80 в концентрации 0,01-0,2% (такой как 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,15% или 0,2%, или 0,02-0,08%, или 0,03-0,07%, или 0,04-0,06%);

в составе конъюгата антитело-лекарственное средство концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство составляет 1-20 мг/мл (как например, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 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 или 20 мг/мл, или 3-5 мг/мл, или 2-6 мг/мл, или 1-7 мг/мл, или 1-8 мг/мл, или 1-9 мг/мл, или 1-10 мг/мл).

[0056] В некоторых вариантах осуществления концентрация цитратного буфера составляет 15 мМ-25 мМ.

[0057] В некоторых вариантах осуществления концентрация цитратного буфера составляет 20 мМ.

[0058] В некоторых вариантах осуществления рН цитратного буфера составляет 6,3-6,5.

[0059] В некоторых вариантах осуществления рН цитратного буфера составляет 6,3.

[0060] В некоторых вариантах осуществления концентрация трегалозы составляет 4%-7%.

[0061] В некоторых вариантах осуществления концентрация трегалозы составляет 5,5%.

[0062] В некоторых вариантах осуществления концентрация NaCl составляет 0,1%-0,5%.

[0063] В некоторых вариантах осуществления концентрация NaCl составляет 0,3%.

[0064] В некоторых вариантах осуществления концентрация Tween 80 составляет 0,01%-0,1%.

[0065] В некоторых вариантах осуществления концентрация Tween 80 составляет 0,05%.

[0066] В некоторых вариантах осуществления концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство составляет 2 мг/мл-6 мг/мл.

[0067] В некоторых вариантах осуществления концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство составляет 4 мг/мл.

[0068] В некоторых вариантах осуществления трегалоза представляет собой дигидрат трегалозы.

[0069] В некоторых вариантах осуществления цитратный буфер получают из лимонной кислоты и цитрата натрия.

[0070] В некоторых вариантах осуществления лимонная кислота представляет собой моногидрат лимонной кислоты.

[0071] В некоторых вариантах осуществления цитрат натрия представляет собой дигидрат цитрата натрия.

[0072] В третьем аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к составу конъюгата антитело-лекарственное средство, полученному способом, описанным выше.

[0073] В четвертом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к композиции, содержащей состав, описанный выше.

[0074] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит известное химиотерапевтическое лекарственное средство для лечения опухоли, и химиотерапевтическое средство может представлять собой, например, доксорубицин (Адриамицин), циклофосфамид и таксаны [например, паклитаксел (Таксол) и доцетаксел (Таксотер)], капецитабин (Кселода), гемцитабин (Гемзар), винорелбин (Навелбин), тамоксифен, ингибитор ароматазы (Аримидекс, Фемара, Аромасин), 5-FU/лейковорин,

иринотекан (камптосар), оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, эстрамустин, митоксантрон (Новантрон), преднизон, винкристин (Онковин), Доксорубицин, преднизон и т.д., или их комбинацию.

[0075] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит известное иммунотерапевтическое лекарственное средство для лечения опухоли, где иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой, например, моноклональное антитело против PD-1 (такое как Пембролизумаб и Ниволумаб), моноклональное антитело против PD-L1 (такое как Атезолизумаб), моноклональное антитело против TIGIT, моноклональное антитело против 4-1BB, моноклональное антитело против VEGFR2 (такое как Рамуцирумаб и Апатиниб), моноклональное антитело против HER2 (такое как Трастузумаб, биосимиляр Трастузумаба и Трастузумаб-dkst) и т.д., или их комбинацию.

[0076] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит иммуносупрессивное средство, выбранное из: (1) глюкокортикоида, такого как кортизон и преднизон; (2) микробного метаболита, такого как циклоспорин и такролимус и т.д.; (3) антиметаболита, такого как азатиоприн и 6-меркаптопурин и т.д.; (4) поликлональных и моноклональных антилимфоцитарных антител, таких как антитело против лимфоцитарного глобулина и ОКТ3, и т.д.; (5) алкилирующего средства, такого как циклофосфамид. В частности, иммуносупрессивное средство представляет собой, например, метилпреднизолон, преднизон, азатиоприн, Програф, Зенапакс, Симулект, циклоспорин, такролимус, рапамицин, микофенолат, мизорибин, циклофосфамид, Финголимод и т.д.

[0077] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

[0078] В пятом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к применению состава, описанного выше, или композиции, описанной выше, для получения лекарственного средства для предупреждения и/или лечения связанного с EGFR заболевания.

[0079] В шестом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к составу, описанному выше, или композиции, описанной выше, для применения для предупреждения и/или лечения связанного с EGFR заболевания.

[0080] В седьмом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу предупреждения и/или лечения связанного с EGFR заболевания, включающему: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, профилактически и/или терапевтически эффективного количества состава, описанного выше, или композиции, описанной выше.

[0081] В некоторых вариантах осуществления связанное с EGFR заболевание представляет собой связанную с EGFR опухоль, такую как опухоль со сверхэкспрессией EGFR, дополнительно выбранную, например, из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака головы и шеи, рака легкого, рака яичника, рака шейки

матки, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудка, рака поджелудочной железы и глиомы головного мозга.

[0082] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене KRAS, дополнительно, например, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак легкого или рак поджелудочной железы с мутацией в гене KRAS.

[0083] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене BRAF, например, дополнительно выбранную из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки и рака легкого с мутацией в гене BRAF.

[0084] В восьмом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к применению состава, описанного выше, или композиции, описанной выше, для получения реагента или лекарственного средства для ингибирования ангиогенеза опухоли, замедления прогрессирования опухоли, ингибирования роста опухоли или ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

[0085] В девятом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к составу, описанному выше, или композиции, описанной выше, для применения для ингибирования ангиогенеза опухоли, замедления прогрессирования опухоли, ингибирования роста опухоли или ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

[0086] В десятом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу ингибирования ангиогенеза опухоли, замедления прогрессирования опухоли, ингибирования роста опухоли или ингибирования пролиферации опухолевых клеток, включающему: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества состава, описанного выше, или композиции, описанной выше.

[0087] В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака головы и шеи, рака легкого, рака яичника, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудка, рака поджелудочной железы и глиомы головного мозга.

[0088] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене KRAS, дополнительно, например, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак легкого или рак поджелудочной железы с мутацией в гене KRAS.

[0089] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене BRAF, например, дополнительно выбранную из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки и рака легкого с мутацией в гене BRAF.

[0090] Полезный эффект

Внешний вид состава конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению остается прозрачным в условиях разных температур, его DAR остается практически неизменным, его количество HMW% и % кислотного пика являются умеренными, и стабильность этого состава является значительно улучшенной по

сравнению с уровнем техники.

Краткое описание чертежей

[0091] На фиг.1 представлена хроматограмма НИС-ВЭЖХ для определения соотношения лекарственное средство/антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство.

[0092] На фиг.2 представлены результаты детекции активности в отношении ингибирования клеток *in vitro* у моноклонального антитела и конъюгата антитело-лекарственное средство, где ○ обозначает моноклональное антитело ВА03 и ▲ обозначает конъюгат антитело-лекарственное средство МУК-3.

[0093] На фиг.3 представлена активность МУК-3 в отношении ингибирования роста клеток рака толстой кишки НТ-29, где ○ обозначает моноклональное антитело ВА03 и ▲ обозначает конъюгат антитело-лекарственное средство МУК-3.

[0094] На фиг.4 представлена активность МУК-3 в отношении ингибирования роста злокачественных клеток глиомы головного мозга U87-MG, где ○ обозначает моноклональное антитело ВА03 и ▲ обозначает конъюгат антитело-лекарственное средство МУК-3.

[0095] На фиг.5 представлена активность МУК-3 в отношении ингибирования роста клеток рака легкого А549, где ○ обозначает моноклональное антитело ВА03 и ▲ обозначает конъюгат антитело-лекарственное средство МУК-3.

[0096] На фиг.6 представлена активность МУК-3 в отношении ингибирования роста клеток рака толстой кишки с мутантным KRAS LoVo, где ○ обозначает моноклональное антитело Эрбитукс и ▲ обозначает конъюгат антитело-лекарственное средство МУК-3.

[0097] На фиг.7 представлены эффекты моноклонального антитела и конъюгатов антитело-лекарственное средство на объем ксенотрансплантированной опухоли рака толстой кишки НТ-29 у мышей, где данные выражены в качестве среднего значения ± стандартное отклонение; * указывает на $P < 0,05$, ** указывает на $P < 0,01$ и *** указывает на $P < 0,001$ по сравнению с группой контроля в виде буфера.

[0098] На фиг.8 представлены эффекты моноклонального антитела и конъюгата антитело-лекарственное средство на массу тела у мышей в модели с ксенотрансплантатом рака толстой кишки НТ-29.

[0099] На фиг.9 представлена активность МУК-3 в отношении ингибирования ксенотрансплантированной опухоли рака толстой кишки с мутантным KRAS LoVo у мышей nude.

[00100] На фиг.10 представлено сравнение изменений качественных признаков МУК-3 в цитратных буферах при разных значениях pH.

Подробное описание вариантов осуществления

[0101] Варианты осуществления изобретения подробно описаны ниже с помощью примеров. Однако специалистам в данной области будет понятно, что приведенные ниже примеры используются только для иллюстрации изобретения, а не для ограничения

объема изобретения. Варианты осуществления без конкретных условий в примерах, как правило, осуществляются в общепринятых условиях или условиях, рекомендованных изготовителями. Реагенты или устройства, используемые без указания изготовителей, во всех случаях являются общепринятыми продуктами, которые могут быть приобретены коммерчески.

[0102] В рамках изобретения все научные и технические термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, хорошо понятные специалистам в данной области, если нет иных конкретных указаний. Кроме того, термины, касающиеся химии белков и нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, культуры клеток и тканей, микробиологии, иммунологии и лабораторных методик, используемые в настоящем описании, во всех случаях являются терминами и рутинными методиками, широко используемыми в соответствующей области. Более того, определения и пояснения соответствующих терминов приведены ниже для лучшего понимания изобретения.

[0103] Если нет иных указаний, в рамках изобретения любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или числовой диапазон подразумевает включение любого целого числа из указанного диапазона и, когда это целесообразно, дробных величин из указанного диапазона.

[0104] Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, относится к молекуле иммуноглобулина, обычно состоящей из двух пар идентичных полипептидных цепей, где каждая пара имеет "легкую" (L) цепь и "тяжелую" (H) цепь. Легкие цепи антитела могут быть подразделены на две категории: κ и λ . Тяжелые цепи могут быть подразделены на пять категорий: μ , δ , γ , α или ϵ . В соответствии с различием тяжелых цепей, антитела могут быть разделены на пять категорий: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких и тяжелых цепях переменные и константные области соединены областью "J" приблизительно из 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь также имеет область "D" приблизительно из 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . Константные области антитела могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компонент C1q системы комплемента. V_H и V_L также могут быть подразделены на высокопеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми находятся более консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из, от N-конца к C-концу, трех CDR и четырех FR, расположенных в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют связывающий центр антитела, соответственно. Отнесение аминокислоты к каждой области или структурному домену осуществляется в

соответствии с определением Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883.

[0105] Вариант моноклонального антитела, описанный в настоящем описании, может быть получен посредством традиционных способов генной инженерии. Специалистам в данной области хорошо знакомы способы модификации молекул ДНК с использованием мутаций нуклеиновых кислот. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты тяжелой цепи и легкой цепи, также могут быть получены посредством химического синтеза.

[0106] В рамках настоящего изобретения алгоритмы, используемые для определения идентичности последовательностей (гомология) и процентного сходства последовательностей, представляют собой, например, алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, соответственно, описанные Altschul et al., (1977) Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402 и Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. BLAST и BLAST2.0 могут использоваться для определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению с использованием, например, параметров, описанных в ссылках, или параметров по умолчанию. Программное обеспечение, используемое для проведения анализа BLAST, является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации.

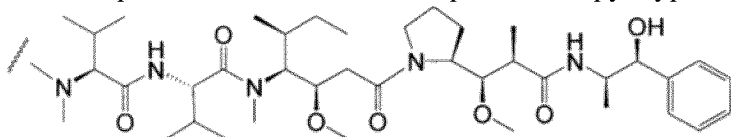
[0107] Как описано в настоящем описании, указанная аминокислотная последовательность, обладающая по меньшей мере 70% идентичностью с некоторой аминокислотной последовательностью, включает полипептидную последовательность, которая по существу идентична указанной аминокислотной последовательности, например, последовательности, обладающие идентичностью по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше с полипептидной последовательностью по изобретению при использовании способов, описанных в настоящем описании (таких как анализ BLAST с использованием стандартных параметров).

[0108] Мутант указанной аминокислотной последовательности, как используют в рамках изобретения, относится к последовательности, которая обладает идентичностью более 70%, как например, более 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, с указанной аминокислотной последовательностью, такой как последовательность, имеющая три, две или одну замену, делецию или вставку аминокислот. Предпочтительно, не более трех аминокислот заменено, вставлено или удалено. Более предпочтительно, не более двух аминокислот заменено, вставлено или удалено. Наиболее предпочтительно, не более одной аминокислоты заменено, вставлено или удалено.

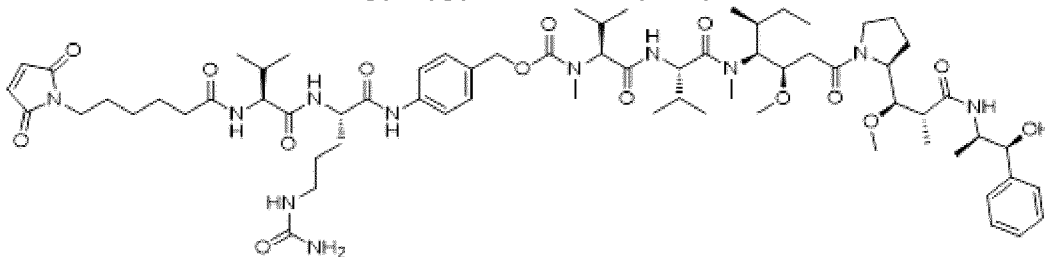
[0109] Вариант "с заменой" представляет собой вариант, в котором по меньшей мере один аминокислотный остаток в нативной последовательности удален и отличающийся аминокислотный остаток встроен в то же положение. Замены могут быть

единичными, где в молекуле заменена только одна аминокислота, или множественными, где в одной молекуле заменено две или более аминокислот. Множественные замены могут быть внесены в соседние участки. Аналогично, одна аминокислота может быть заменена несколькими остатками, где такие варианты включают как замены, так и инсерции. Вариант с "инсерцией" (или "вставкой") представляет собой вариант, в котором одна или несколько аминокислот встроены в конкретном положении непосредственно рядом с нативной последовательностью. Непосредственно рядом с аминокислотой означает присоединение к альфа-карбоксильной или альфа-амино функциональной группе аминокислоты. Вариант с "делецией" представляет собой вариант, в котором одна или несколько аминокислот в нативной аминокислотной последовательности удалены. Как правило, делеционные варианты имеют делецию одной или двух аминокислот в конкретной области их молекулы.

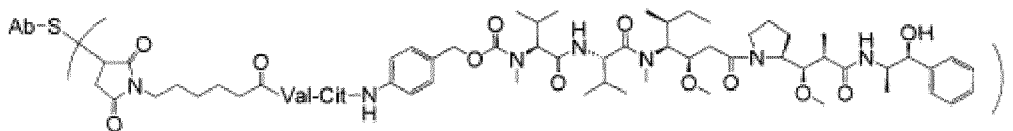
[0110] В рамках настоящего изобретения структура MMAE представляет собой



[00111] В рамках настоящего изобретения L-D в формуле I представляет собой MC-vc-PAV-MMAE, имеющий структуру, соответствующую:



[0112] В рамках настоящего изобретения антитело Ab против EGFR соединено с L-D через тиол, образовавшийся после восстановления его собственной дисульфидной связи, как показано ниже:



[0113] В рамках настоящего изобретения соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) или лекарственная нагрузка обозначается как p , т.е. среднее количество модулей лекарственного средства (т.е. цитотоксических агентов) на антитело в молекуле формулы I: $Ab-(L-D)_p$, которое может представлять собой целое или дробное число. ADC общей формулы I включает совокупность антител, конъюгированных с диапазоном модулей лекарственного средства. Среднее количество модулей лекарственного средства в составе ADC после реакции конъюгации может быть определено общепринятыми способами, такими как масс-спектрометрия, ELISA, НИС и ВЭЖХ. Также может быть

определено количественное распределение ADC в отношении p . В некоторых случаях разделение, очистка и подтверждение однородных ADC с p определенной величины от ADC с другими DAR могут быть достигнуты такими способами, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез.

[0114] В определенных вариантах осуществления в реакции конъюгации с антителом конъюгируется менее чем теоретический максимум лекарственных частей. Как правило, антитела не содержат множество свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут соединять лекарственные части; в действительности, большинство тиольных групп цистеина в антителах существуют в качестве дисульфидных мостиков. В определенных вариантах осуществления антитело может быть восстановлено посредством восстановителя, такого как дитиотреитол (DTT) или трис(2-карбок시에тил)фосфин (TCEP), в частично или полностью восстанавливающих условиях с образованием реакционноспособных тиольных групп цистеина

[0115] В рамках настоящего изобретения "лечение" относится к клиническому вмешательству, которое проводится для изменения естественного течения у индивидуума или клетки, подвергаемых лечению, либо для предупреждения, либо в процессе клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают предупреждение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, смягчение каких-либо прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предупреждение метастазов, замедление прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение болезненного состояния, и устранение или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению используют для отсрочивания возникновения заболевания или нарушения, или для замедления прогрессирования заболевания или нарушения. Описанные выше параметры для оценки успешного лечения и облегчения заболевания могут быть без труда определены с использованием стандартных методик, известных врачам. Для лечения злокачественной опухоли эффективность может быть определена, например, путем оценки времени до прогрессирования заболевания (TTP) и/или определения частоты ответа (RR).

[0116] В рамках настоящего изобретения термин "индивидуум" относится к позвоночным. В некоторых вариантах осуществления позвоночные представляют собой млекопитающих. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственных животных (таких как крупный рогатый скот), питомцев (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс. В некоторых вариантах осуществления млекопитающие относятся к людям.

[0117] В рамках настоящего изобретения "эффективное количество" относится к количеству, эффективному для достижения желаемого терапевтического или профилактического эффекта в необходимой дозе и момент времени. "Терапевтически эффективное количество" вещества/молекулы по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол

и масса тела индивидуума, и способность вещества/молекулы индуцировать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также охватывает количество, в котором какие-либо токсичные и неблагоприятные последствия вещества/молекулы перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в необходимой дозе и в течение необходимого времени, для достижения желаемого профилактического эффекта. Обычно, но не обязательно, профилактически эффективное количество является меньшим, чем терапевтически эффективное количество, поскольку профилактическую дозу вводят индивидууму до возникновения заболевания или на ранней стадии заболевания. В случае злокачественной опухоли терапевтически эффективное количество лекарственного средства уменьшает количество злокачественных клеток; уменьшает размер опухоли; ингибирует (т.е. замедляет до некоторой степени, предпочтительно останавливает) инфильтрацию злокачественных клеток в окружающие органы; ингибирует (т.е. замедляет до некоторой степени, предпочтительно останавливает) метастазирование опухоли; ингибирует рост опухоли до некоторой степени и/или облегчает один или несколько симптомов, ассоциированных со злокачественной опухолью, до некоторой степени.

[0118] Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (когда его используют отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтические средства) зависит от типа подвергаемого лечению заболевания, типа конъюгата антитело-лекарственное средство, тяжести и прогрессирования заболевания, введения конъюгата антитело-лекарственное средство для профилактических или терапевтических целей, предшествующих способов терапии, клинического анамнеза пациента и реактивности конъюгата антитело-лекарственное средство, и мнения лечащего врача. В подходящем случае конъюгат антитело-лекарственное средство вводят пациенту либо однократно, либо путем серии введений.

[0119] "Фармацевтически приемлемый носитель", как используют в рамках изобретения, как правило, включает фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клеток или млекопитающих, которые подвергаются их воздействию, в используемых дозах и концентрациях. Как правило, физиологически приемлемые носители относятся к водным рН-буферным растворам. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфаты, цитраты и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу или

декстрин; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICSTM.

[0120] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль неорганической кислоты или соль органической кислоты, где соль неорганической кислоты представляет собой гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, нитрат, бикарбонат, карбонат, сульфат или фосфат, соль органической кислоты представляет собой формиат, ацетат, пропионат, бензоат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, цитрат, аскорбат, α -кетоглутарат, α -глицерофосфат, алкилсульфонат или арилсульфонат; предпочтительно, алкилсульфонат представляет собой метансульфонат или этансульфонат; арилсульфонат представляет собой бензолсульфонат или п-толуолсульфонат.

[0121] Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены с использованием стандартных методик, хорошо известных в данной области, например, путем реакции достаточного количества основного соединения с подходящей кислотой, которая предоставляет фармацевтически приемлемый анион.

[0122] В рамках настоящего изобретения ген KRAS имеет то же значение, что и ген K-RAS. Он является представителем семейства генов RAS, кодирующих белок K-ras, и он связан с образованием, пролиферацией, миграцией, диффузией и ангиогенезом различных опухолей. Его частыми участками мутации являются кодоны 12 и 13 экзона 2 гена K-RAS и кодон 61 экзона 3. Существует 7 горячих точек мутаций: G12C, G12R, G12S, G12V, G12D, G12A и G13V/D. Эти 7 мутаций составляют более 90%. В одном варианте осуществления настоящего изобретения опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене KRAS, связанной со сверхэкспрессией EGFR.

[0123] В рамках настоящего изобретения ген BRAF (гомолог B1 вирусного онкогена v-raf саркомы мыши) представляет собой протоонкоген и является представителем семейства RAF. Приблизительно 8% опухолей человека имеют мутации BRAF и большинство мутаций в гене BRAF имеют форму мутации BRAFV600E. Эта мутация приводит к непрерывной активации нижеследующего каскада передачи сигнала MEK/ERK, который является ключевым для роста, пролиферации, инвазии и метастазирования опухоли. В одном варианте осуществления настоящего изобретения опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене BRAF, связанной со сверхэкспрессией EGFR.

[0124] В рамках настоящего изобретения 20 общепринятых аминокислот и их сокращенные обозначения соответствуют общепринятому применению. См. *Immunology-A Synthesis* (вторая версия, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0125] Антитело BA03 в настоящей заявке представляет собой BA03 патентной заявки Китая CN103772504A. Для способа его получения см. пример 3 в указанной патентной заявке. Последовательности каждой части антитела являются следующими:

[0126] последовательность вариабельной области тяжелой цепи представляет собой:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSG
GNTDYNTPFTRSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDYDYEFAYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO : 1).

[0127] В последовательности подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) и CDR3 (SEQ ID NO: 7), соответственно;

[0128] части без подчеркивания представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 8), FR2 (SEQ ID NO: 9), FR3 (SEQ ID NO: 10) и FR4 (SEQ ID NO: 11), соответственно.

[0129] Последовательность вариабельной области легкой цепи представляет собой:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGI
PSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSEFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 2).

[0130] В последовательности подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 13) и CDR3 (SEQ ID NO: 14), соответственно;

[0131] части без подчеркивания представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 15), FR2 (SEQ ID NO: 16), FR3 (SEQ ID NO: 17) и FR4 (SEQ ID NO: 18), соответственно.

[0132] Последовательность константной области тяжелой цепи представляет собой:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3).

[0133] Последовательность константной области легкой цепи представляет собой:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 4).

[0134] Настоящее изобретение дополнительно описано ниже с помощью конкретных вариантов осуществления.

Пример 1: Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство

10 мг антитела ВА03 подвергали замене буфера на восстанавливающий буфер (25 мМ борат натрия, pH 8,0, 25 мМ NaCl, 5 мМ EDTA) с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа, всего три раза (конечный объем составлял приблизительно 1 мл), переносили в новую центрифужную пробирку Eppendorf (взвешенную) и взвешивали. Проводили детекцию концентрации белка и вычисляли общее количество белка. К антителу добавляли в 2,5 раза большее молярное количество DTT, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч и тщательно перемешивали. Смесь подвергали замене буфера на буфер для присоединения (50 мМ Tris, pH 7,2, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA) с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа, всего три раза. Концентрированный раствор отбирали, подвергали измерению

концентрации белка при A280 и взвешивали, и вычисляли общее количество белка. 10 мкл образца отбирали для определения количества свободных тиольных групп с использованием теста Элмана;

и молярную концентрацию свободных тиольных групп вычисляли по следующей формуле:

$$C_{\text{тиол}} = \frac{A_{412} \times 11.2}{b \times 14150} \text{ (M)}$$

b: длина оптического пути кюветы (обычно 1 см).

Количество моль свободных тиольных групп вычисляли на основе молярной концентрации свободных тиольных групп и объема общего раствора белка.

К восстановленному антителу добавляли *vc*-ММАЕ (приобретен у Shanghai Naoyuan Chemexpress Co., Ltd., каталожный номер № HY-15575) (растворенный в DMSO), в количестве, в 1,1 раза превышающем количество свободных тиольных групп, и смесь хорошо перемешивали для реакции при комнатной температуре в течение 2 ч при периодическом перемешивании. В реакционную систему добавляли N-ацетилцистеин в количестве, в 20 раз превышающем количество *vc*-ММАЕ. Реакционную смесь хорошо перемешивали и позволяли ей стоять в течение 5 мин. Смесь подвергали замене буфера на исходный раствор для конъюгации (20 мМ Na-цитрат, 0,3% NaCl, 5% трегалоза, 0,05% Tween-80, pH 6,0) с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа, всего три раза, с получением конъюгата антитело-лекарственное средство МҮК-3. Образец хранили при 4°C. Следует отметить, что конъюгат антитело-лекарственное средство МҮК-3 был получен после гашения реакции конъюгации N-ацетилцистеином. Последующую стадию (т.е. смесь подвергали замене буфера на исходный раствор для конъюгации с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа) проводили для помещения конъюгата антитело-лекарственное средство МҮК-3 в исходный раствор для конъюгации для хранения и последующего применения.

Определение соотношения лекарственного средства и антитела:

Полученный конъюгат антитело-лекарственное средство МҮК-3 анализировали посредством НИС-ВЭЖХ (Jun Ouyang, Drug-To-Antibody (DAR) Ratio and Drug Distribution by Hydrophobic Interaction Chromatography and Reverse Phase High Performance Chromatography, Laurent Ducry (ed.), Antibody Drug Conjugates, Chapter 17, Methods in Molecular Biology, Vol 1045, p275-283) для определения соотношения лекарственного средства и антитела (DAR). Как показано на фиг.1 среднее DAR, вычисленное на основе площади пика спектра, составило 4,1.

Пример 2: Детекция активности конъюгата антитело-лекарственное средство МҮК-3 в отношении ингибирования клеток *in vitro*

Способ детекции активности ингибирования клеток:

1.1 После пассирования восстановленных клеточных линий в течение 3-4 поколений культуральную среду сначала удаляли, затем ополаскивали один раз 5 мл DPBS, расщепляли 3 мл трипсина, ресуспендировали в культуральной среде и центрифугировали с использованием центрифуги. Супернатант выбрасывали. Клетки

вновь ресуспендировали культуральной средой. 0,5 мл клеточной суспензии отбирали для подсчета клеток с помощью счетчика клеток. Клетки высевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток (клетки DiFi высевали в количестве 10000 клеток/лунка, клетки HT-29 высевали в количестве 5000 клеток/лунка, клетки A549 высевали в количестве 2000 клеток/лунка, клетки U87-MG высевали в количестве 3000 клеток/лунка и клетки LoVo высевали в количестве 4000 клеток/лунка). После культивирования в течение 24 ч добавляли моноклональное антитело BA03 и конъюгат антитело-лекарственное средство МУК-3, разведенные до серии концентраций, и инкубировали в течение 72 ч. Затем в каждую лунку добавляли 20 мкл цветного реагента ССК8, тестировали OD450-650 при длине волны 450-650 на устройстве для считывания микропланшетов и проводили четырехпараметрическую аппроксимацию.

Результаты детекции активности ингибирования клеток *in vitro*:

Указанные ниже клеточные линии были приобретены у Шанхайского института клеточной биологии, Академия наук Китая.

Активность в клетках DiFi (клетки рака ободочной и прямой кишки человека) с высокой экспрессией EGFR: МУК-3 имел значимо более высокую активность ингибирования роста клеток, чем моноклональное антитело BA03, и EC_{50} была более низкой приблизительно в 10 раз (EC_{50} BA03 составила 51,9 нг/мл, и EC_{50} МУК-3 составила 5,1 нг/мл), как показано на фиг.2.

Активность в других опухолевых клетках с умеренной и низкой экспрессией EGFR: по сравнению непосредственно с моноклональным антителом, МУК-3 также продемонстрировал очевидную активность ингибирования роста клеток в отношении злокачественных клеток (клетки рака толстой кишки человека HT29, клетки рака легкого человека A549, клетки астроblastомы головного мозга человека U87-MG) с умеренной и низкой экспрессией EGFR (как показано на фиг.3, фиг.4 и фиг.5), где EC_{50} HT-29 составила 611 нг/мл, EC_{50} A549 составила 28,3 мкг/мл и EC_{50} U87-MG составила 5,3 мкг/мл.

Кроме того, авторы изобретения также протестировали его активность в LoVo, клетках рака толстой кишки с мутантным KRAS с умеренной экспрессией EGFR (Dunn EF, Iida M, Myers RA, Hintz KA, Campbell DA, Armstrong EA, Li C and Wheeler DL. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab. *Oncogene* 2011; 30: 561-574), и обнаружили, что МУК-3 продемонстрировал выраженную активность ингибирования роста клеток рака толстой кишки с мутантным KRAS LoVo (как показано на фиг.6, EC_{50} составила 3,2 мкг/мл), однако BA03 практически не обладало ингибиторной активностью против этой клеточной линии при использовании отдельно.

Пример 3: Тест с ксенотрансплантатом опухоли у мышей *in vivo*

Экспериментальный способ теста с ксенотрансплантатом опухоли у мышей *in vivo*:

Клетки рака толстой кишки HT-29 представляли собой клеточные линии с относительно низкой экспрессией EGFR и с мутациями BRAF, и нацеленное на EGFR моноклональное антитело Эрбитукс, в настоящее время имеющееся на рынке для лечения

рака ободочной и прямой кишки, не имело активности ингибирования роста опухоли из клеточной линии HT-29.

Модель с ксенотрансплантацией клеток HT-29: опухолевые клетки на логарифмической фазе роста собирали и подсчитывали, а затем ресуспендировали в $1 \times \text{PBS}$. Концентрацию клеточной суспензии доводили до $3 \times 10^7 / \text{мл}$. Опухолевые клетки инокулировали подкожно в правую сторону спины мышей *nude* с использованием 1-мл шприца (игла калибра 4), $3 \times 10^6 / 0,1 \text{ мл/мышь}$. Когда объем опухоли достигал 150-200 мм^3 , мышей распределяли на группы способом рандомизированных блоков, 8 мышей на группу, чтобы убедиться, что объем опухоли и масса тела мышей между группами были единообразными. Различия между средней величиной объема опухоли в каждой группе и средней величиной объема опухоли у всех экспериментальных животных составляло не более $\pm 10\%$. Введение в хвостовую вену проводили один раз в четверо суток (1-е, 5-е, 9-е и 13-е сутки) на протяжении всего 4 раз и объемы опухоли и массы тела мышей регулярно измеряли. В каждой группе мышей было по 8 мышей.

Результаты эксперимента в исследовании с ксенотрансплантатом опухоли у мышей

Тест с ксенотрансплантатом рака толстой кишки HT-29 у мышей: в тесте было 5 групп, включая группу буферного раствора (20 мМ цитрат натрия, 0,3% хлорид натрия, 5% трегалоза, 0,05% Tween 80, pH 6), группу моноклонального антитела BA03 (5 мг/кг), группу МУК-3 (1 мг/кг), группу МУК-3 (5 мг/кг) и группу несвязывающего ADC (5 мг/кг) (конъюгат IgG человека-vcMMAE, где IgG представлял собой IgG, полученный посредством очистки из сыворотки человека, и этот конъюгат был получен тем же способом, что и МУК-3). Объем опухоли ксенотрансплантата у мышей, которым вводили МУК-3, был значительно более низким, чем в контрольной группе, демонстрируя выраженный эффект против роста опухоли (фиг.7). На 18-е сутки для группы МУК-3 в дозе 5 мг/кг его степень ингибирования роста опухоли составила вплоть до 54% по сравнению с группой буферного раствора, и его степень ингибирования роста опухоли составила вплоть до 46% по сравнению с группой моноклонального антитела BA03 в той же дозе, и его степень ингибирования роста опухоли составила вплоть до 42% по сравнению с несвязывающим ADC.

Масса тела мышей: масса тела мышей, которым вводили МУК-3, продемонстрировала отсутствие значимых изменений по сравнению с контрольной группой (см. фиг. 8), что указывает на то, что МУК-3 не имел токсического эффекта в виде снижения массы тела мышей.

Пример 4: Активность МУК-3 в отношении ингибирования роста ксенотрансплантированных опухолей из клеток рака толстой кишки с мутантным KRAS LoVo у мышей *nude*

В соответствии с построением модели (инокуляция опухолевых клеток в количестве 2×10^6 клеток/0,1 мл/мышь) и способом введения примера 3, проводили тестирование активности МУК-3 в отношении ингибирования роста ксенотрансплантированных опухолей из клеток рака толстой кишки с мутантным KRAS

LoVo у мышей nude. Эксперимент проводили в шести группах, включая группу раствора буфера для разведения (20 мМ Na-цитрат, 0,3% NaCl, 5% трегалоза, 0,05% Tween 80, pH 6), группу моноклонального антитела Эрбитукса (3 мг/кг), группы МУК-3 (с тремя дозами 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг) и контрольную группу несвязывающего ADC (3 мг/кг), где несвязывающий контрольный ADC соответствовал контролю в виде несвязывающего ADC (который представлял собой mAb против CD20-vcMMAE) с той же нагрузкой. Способ получения конъюгата был таким же, как и способ получения МУК-3. Результаты эксперимента представлены на фиг.9.

Как можно видеть из фигуры, МУК-3 продемонстрировал полное ингибирование роста опухоли из клеток LoVo в дозе 3 мг/кг, и МУК-3 в дозе 1 мг/кг продемонстрировал более высокую активность, чем имеющееся на рынке лекарственное средство Эрбитукс в дозе 3 мг/кг.

Пример 5. Эффект pH на стабильность МУК-3

С использованием конъюгата антитело-лекарственное средство, полученного согласно примеру 1, в качестве исходной точки, автор изобретения провел более тщательное исследование в отношении pH. Результаты показали, что pH оптимального состава МУК-3 составляет 6,3. Следовательно, оптимальный состав включает 20 мМ цитратный буфер, 5,5% дигидрата трегалозы, 0,3% NaCl и 0,05% PS80, pH 6,3, и концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство МУК-3 составляет 4 мг/мл.

Для изучения эффекта разных значений pH на качество МУК-3 в 20 мМ цитратном буфере (содержащем 5,5% дигидрата трегалозы, 0,3% NaCl и 0,05% PS80), использовали ту же методику, что и в примере 1, за исключением состава (составы F1-F5, подлежащие исследованию) исходного раствора для конъюгации, на который в продукте реакции конъюгации заменяли буфер с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа, после гашения реакции конъюгации N-ацетилцистеином.

Составы F1-F5, подлежащие исследованию, имели ту же композицию и концентрацию, за исключением pH цитратного буфера. В частности: 4 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство МУК-3, 20 мМ цитратный буфер, pH 5,6 (F1), 6,0 (F2), 6,3 (F3), 6,5 (F4) или 6,7 (F5), 5,5% дигидрата трегалозы, 0,3% NaCl и 0,05% PS80.

В частности, в продукте реакции конъюгации проводили замену на исследуемые составы F1-F5 (pH: 5,6-6,7), а затем проводили исследование при $40 \pm 2^\circ\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{RH}$ в течение 10 суток, и проводили отбор образцов для анализа в указанные моменты времени. Тестируемые параметры включали внешний вид, pH, концентрацию белка, SEC, iCIEF и HIC. Если образец имел мутный вид или имел очевидную опалесценцию, дальнейший анализ не проводили (такой как SEC, iCIEF и HIC). Конкретная схема эксперимента представлена в таблице 1.

Таблица 1 Схема эксперимента для определения эффекта pH (5,6-6,7) на стабильность МУК-3 (в 20 мМ цитратном буфере)

Состав	pH	T0	40±2°C/75%±5%RH	
			3D	7D

F1	5,6	√	√	√
F2	6,0	√	√	√
F3	6,3	√	√	√
F4	6,5	√	√	√
F5	6,7	√	√	√

Примечание: T0 обозначает начальную точку, D обозначает сутки и √ обозначает тест.

С точки зрения внешнего вида, с течением времени образцы F1, помещенные при 40°C на 3 суток, стали мутными, образцы F2, помещенные при 40°C в течение 7 суток, стали мутными, заметную опалесценцию и преципитацию наблюдали в образцах F1 и F2 после снижения температуры до комнатной температуры и 2-8°C, и чем более низким было значение pH, тем более выраженной была преципитация; однако образцы других составов всегда оставались прозрачными и не наблюдали значительных изменений.

Данные тестирования посредством SEC, iCIEF и HIC и тенденции к изменению представлены в таблице 2 и на фиг.10. Поскольку образцы F1, помещенные при 40°C на 3 суток, становились мутными, образцы состава F1 не тестировали посредством SEC, iCIEF и HIC на 3 сутки и 7 суток. Далее, поскольку образцы F2, помещенные при 40°C на 7 суток становились мутными, образцы F2 не тестировали посредством SEC, iCIEF и HIC на 7 суток. Данные HIC показывают, что DAR F3 и F4 практически не изменялось при разных значениях pH (фиг.10c); данные SEC показывают, что при повышении pH скорость роста HMW% F3, F4 и F5 демонстрирует нисходящую тенденцию, и эти нисходящие тенденции являются практически одинаковыми (фиг.10a); данные iCIEF показывают, что при повышении pH, % кислотного пика F3, F4 и F5 демонстрирует восходящую тенденцию, однако восходящая тенденция F3 очевидно является более низкой, чем восходящие тенденции F4 и F5 (фиг.10b). Исходя из приведенных выше данных тестирования и с учетом результатов тестирования внешнего вида, SEC, iCIEF, HIC и т.п., было определено, что оптимальным составом МУК-3 является F3, т.е. pH состава составляет 6,3. Таким образом, количество лимонной кислоты и цитрата натрия в составах корректировали и конечный состав имеет 20 mM цитратный буфер с pH 6,3.

Таблица 2 Экспериментальные данные эффекта pH (5,6-6,7) на стабильность МУК-3 (в 20 mM цитратном буфере)

Состав		SEC			iCIEF			HIC
		HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный пик (%)	Первичный пик (%)	Щелочной пик (%)	
pH 5,6	0 сутки	2,2	97,8	0,1	23,3	49,5	27,3	4,0
	3 сутки	Образцы стали мутными						

рН 6,0	0 сутки	2,3	97,6	0,1	23,0	50,7	26,3	4,0
	3 сутки	11,9	88,0	0,1	24,9	50,7	24,5	4,1
	7 сутки	Образцы стали мутными						
рН 6,3	0 сутки	2,3	97,7	0,1	24,0	48,0	27,9	4,0
	3 сутки	8,6	91,3	0,1	29,9	51,6	18,5	4,0
	7 сутки	10,8	89,1	0,1	34,0	46,7	19,2	4,0
рН 6,5	0 сутки	2,3	97,7	0,1	Тестирование не проводили			4,0
	3 сутки	8,6	91,2	0,1	32,0	51,5	16,5	4,0
	7 сутки	9,9	90,1	0,1	42,0	44,2	13,8	4,0
рН 6,7	0 сутки	2,3	97,7	0,1	21,2	52,2	26,5	4,0
	3 сутки	8,9	91,0	0,1	35,7	45,7	18,6	4,0
	7 сутки	9,8	90,1	0,1	48,1	39,4	12,5	3,9

Исходя из приведенных выше, конечный состав МҮК-3 был следующим:

Адьювант	Цель	Количество (г/л)	Производитель	Стандарт качества
Моногидрат лимонной кислоты	Регулятор рН	0,27	Merck Chemical Technology (Shanghai) Co., Ltd.	ChP
Дигидрат цитрата натрия	Регулятор рН	5,50	J.T Baker	USP
Дигидрат трегалозы	защищающее белки вещество	55,26	Pfanstiehl	ChP
PS80	Вещество, препятствующее прилипанию, защищающее белки вещество	0,50	Nanjing Well Chemical Co., Ltd.	ChP
NaCl	Соль	3,00	Jiangsu Province Qinfen Pharmaceutical Co., Ltd.	ChP

Хотя конкретные варианты осуществления изобретения подробно описаны, специалистам в данной области будет понятно, что можно вносить модификации и замены деталей в соответствии со всеми идеями, которые были описаны, и эти изменения входят

в объем изобретения. Полный объем изобретения приведен в прилагаемой формуле изобретения и любых ее эквивалентах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащий:

конъюгат антитело-лекарственное средство или его соль в концентрации 1-20 мг/мл, предпочтительно 2-6 мг/мл, более предпочтительно 4 мг/мл;

цитратный буфер в концентрации 10-50 мМ, предпочтительно 15-25 мМ, более предпочтительно 20 мМ, и с рН 6,3-6,7, предпочтительно 6,3-6,5, более предпочтительно 6,3;

трегалозу в концентрации 1-10%, предпочтительно 4-7%, более предпочтительно 5,5%;

NaCl в концентрации 0,1-2%, предпочтительно 0,1-0,5%, более предпочтительно 0,3%;

Tween 80 в концентрации 0,01-0,2%, предпочтительно 0,01-0,1% и более предпочтительно 0,05%;

где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы I,

$Ab-(L-D)_p$

формула I

где:

Ab обозначает антитело против EGFR, где антитело против EGFR содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 5-7, или их мутанты, и CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области легкой цепи, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 12-14, или их мутанты;

L обозначает линкер и линкер представляет собой 6-малеимидакапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (MC-vc-PAB);

D обозначает цитотоксическое средство и цитотоксическое средство представляет собой MMAE; и

p обозначает 1-9, предпочтительно 2-6, более предпочтительно 3-5.

2. Состав конъюгата антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело против EGFR имеет один или несколько из следующих признаков:

1) области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариабельной области тяжелой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 8-11, или их мутанты;

2) области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID No: 15-18, или их мутанты;

3) константная область тяжелой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей IgG, IgM, IgA, IgD и IgA человека или их мутантов;

предпочтительно, IgG выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; и

4) константная область легкой цепи антитела против EGFR выбрана из

константных областей лямбда и каппа человека или их мутантов.

3. Состав конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-2, где антитело против EGFR имеет один или несколько из следующих признаков:

1) последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 1, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 1;

предпочтительно, последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 1;

2) последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 2, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 2;

предпочтительно, последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 2;

3) последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 3, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 3;

предпочтительно, последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 3;

4) последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 4, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 4; и

предпочтительно, последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 4.

4. Состав конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, где трегалоза представляет собой дигидрат трегалозы;

или цитратный буфер получен из лимонной кислоты и цитрата натрия;

предпочтительно, лимонная кислота представляет собой моногидрат лимонной кислоты;

предпочтительно, цитрат натрия представляет собой дигидрат цитрата натрия.

5. Способ получения состава по любому из пп. 1-4, включающий:

1) позволение антителу против EGFR по любому из пп. 1-3 подвергаться реакции восстановления с восстановителем с получением восстановленного антитела против EGFR;

2) позволение восстановленному антителу против EGFR подвергаться реакции конъюгации с vcMMAE; и

3) гашение реакции конъюгации и проведение замены буфера в продукте реакции

конъюгации с получением состава конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-4.

6. Способ по п.5, включающий:

(1) замену (предпочтительно три раза) в антителе против EGFR по любому из пп. 1-3 (предпочтительно 10 мг) на буфер для восстановления (предпочтительно содержащий: 25 mM борат натрия, pH 8,0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA), детекцию концентрации белка и вычисление количества белка;

(2) добавление DTT к продукту стадии (1) для реакции при комнатной температуре в течение 1-5 ч (предпочтительно 2 ч) с получением восстановленного антитела против EGFR, где количество вещества DTT в 2,0-3,0 раза, предпочтительно в 2,5 раза, превышает количество вещества белка;

(3) замену в продукте стадии (2) (предпочтительно три раза) на буфер для присоединения (предпочтительно содержащий: 50 mM Tris, pH7,2, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA), и вычисление количества вещества свободных тиольных групп;

(4) добавление *vc*-ММАЕ (т.е. MC-*vc*-РАВ-ММАЕ) к продукту стадии (3) для реакции при комнатной температуре в течение 1-5 ч (предпочтительно 2 ч), где количество вещества *vc*-ММАЕ в 1,0-1,5 раза, предпочтительно в 1,1 раза, превышает количество вещества восстановленного антитела против EGFR;

(5) добавление N-ацетилцистеина к продукту стадии (4) и позволение стоять (предпочтительно в течение 5 мин) с получением смешанного раствора, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где количество вещества N-ацетилцистеина в 15-25 раз, предпочтительно в 20 раз, превышает количество вещества *vc*-ММАЕ; и

(6) замену в смешанном растворе стадии (5) (предпочтительно три раза) на исходный раствор для конъюгации с получением состава конъюгата антитело-лекарственное средство;

причем исходный раствор для конъюгации содержит:

цитратный буфер в концентрации 10-50 mM, предпочтительно 15-25 mM, более предпочтительно 20 mM и с pH 6,3-6,7, предпочтительно 6,3-6,5, более предпочтительно 6,3;

трегалозу в концентрации 1-10%, предпочтительно 4-7%, более предпочтительно 5,5%;

NaCl в концентрации 0,1-2%, предпочтительно 0,1-0,5%, более предпочтительно 0,3%; и

Tween 80 в концентрации 0,01-0,2%, предпочтительно 0,01-0,1%, более предпочтительно 0,05%;

в составе конъюгата антитело-лекарственное средство, концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство составляет 1-20 мг/мл, предпочтительно 2-6 мг/мл, более предпочтительно 4 мг/мл;

предпочтительно, трегалоза представляет собой дигидрат трегалозы;

предпочтительно, цитратный буфер получен из лимонной кислоты и цитрата натрия;

предпочтительно, лимонная кислота представляет собой моногидрат лимонной кислоты;

предпочтительно, цитрат натрия представляет собой дигидрат цитрата натрия.

7. Состав конъюгата антитело-лекарственное средство, полученный способом по любому из пп. 5-6.

8. Композиция, содержащая состав по любому из пп. 1-4 и 7, необязательно дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

9. Применение состава по любому из пп. 1-4 и 7 или композиции по п.8, которое представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

1) получения лекарственного средства для предупреждения и/или лечения связанного с EGFR заболевания;

2) получения реагента или лекарственного средства для ингибирования ангиогенеза опухоли, замедления прогрессирования опухоли, ингибирования роста опухоли или ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

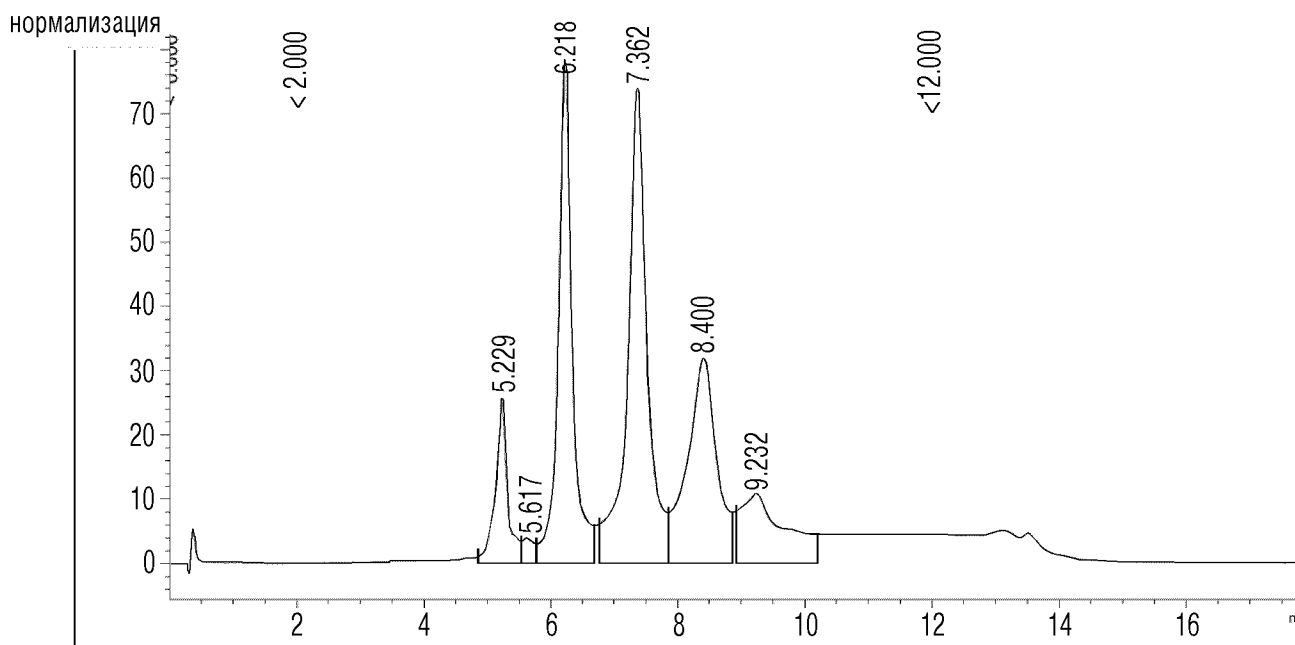
10. Применение по п.9, где связанное с EGFR заболевание представляет собой связанную с EGFR опухоль, такую как опухоль, связанная со сверхэкспрессией EGFR, дополнительно, например, выбранную из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака головы и шеи, рака легкого, рака яичника, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудка, рака поджелудочной железы и глиомы головного мозга;

или опухоль выбрана из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака головы и шеи, рака легкого, рака яичника, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудка, рака поджелудочной железы и глиомы головного мозга;

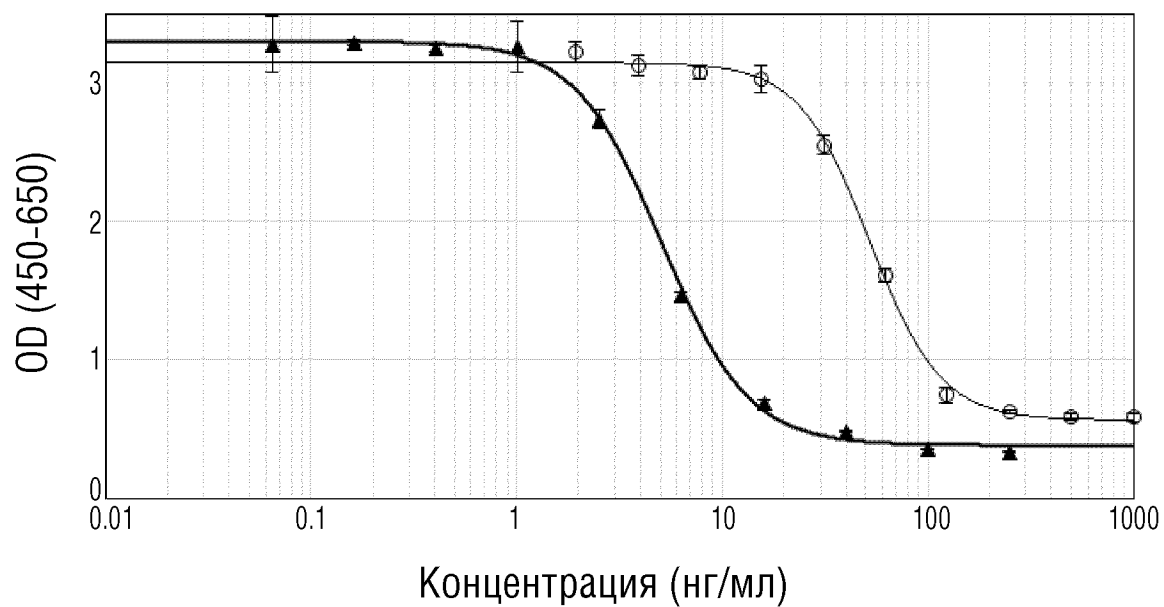
или опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене KRAS, дополнительно, например, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак легкого или рак поджелудочной железы с мутацией в гене KRAS;

или опухоль представляет собой опухоль с мутацией в гене BRAF, например, дополнительно выбранную из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки и рака легкого с мутацией в гене BRAF.

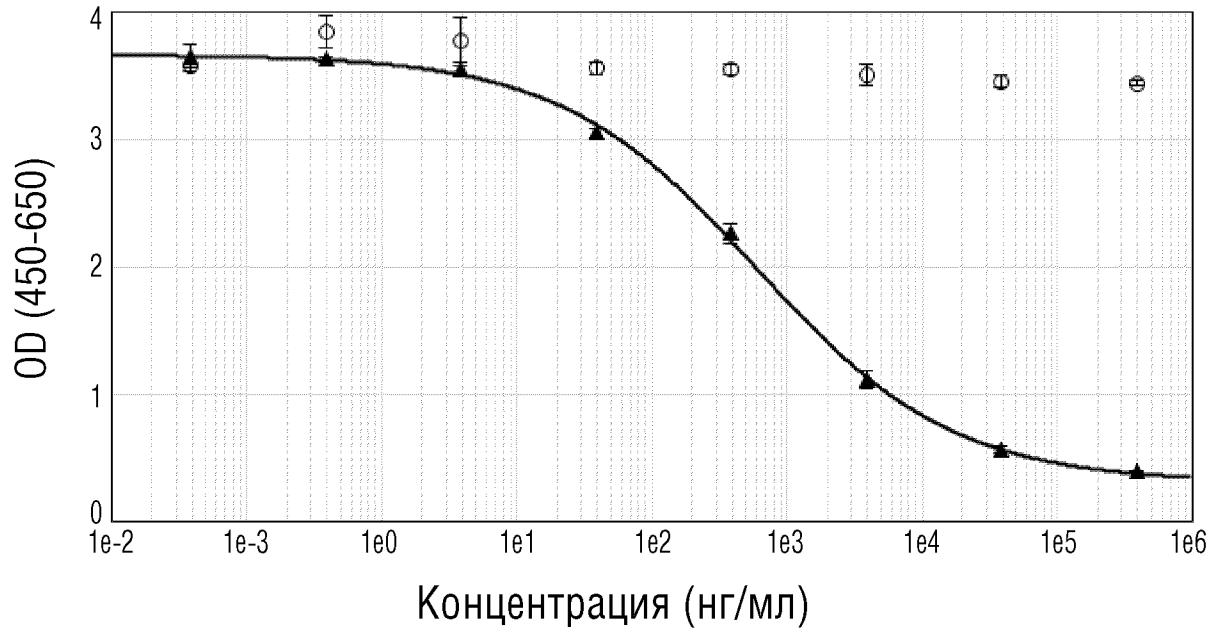
ФИГ.1



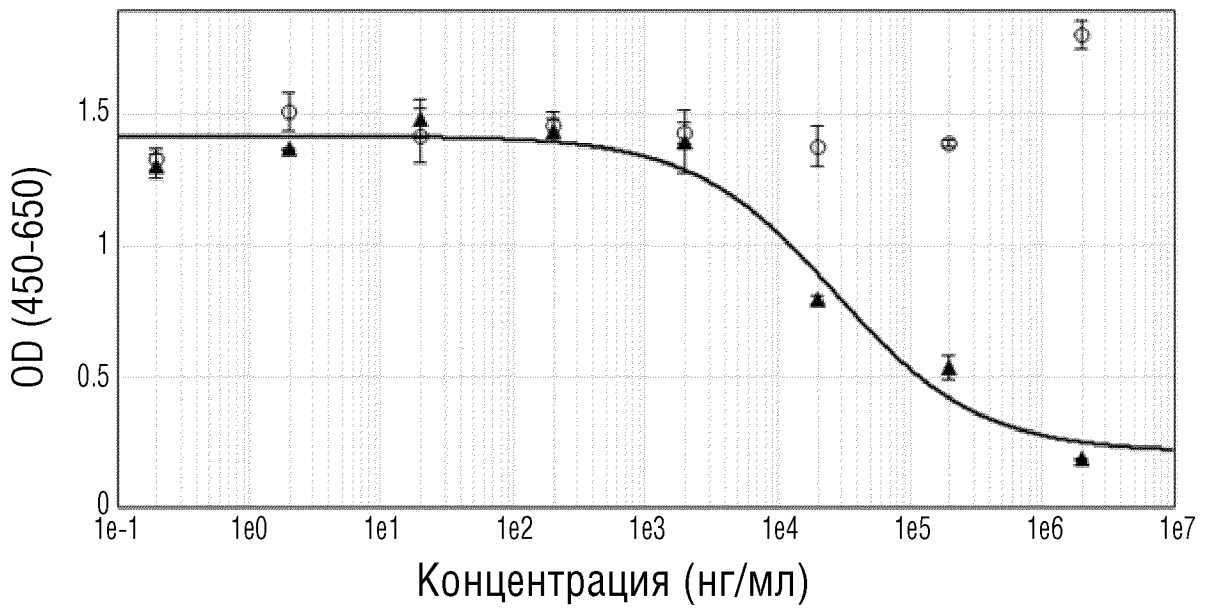
ФИГ.2



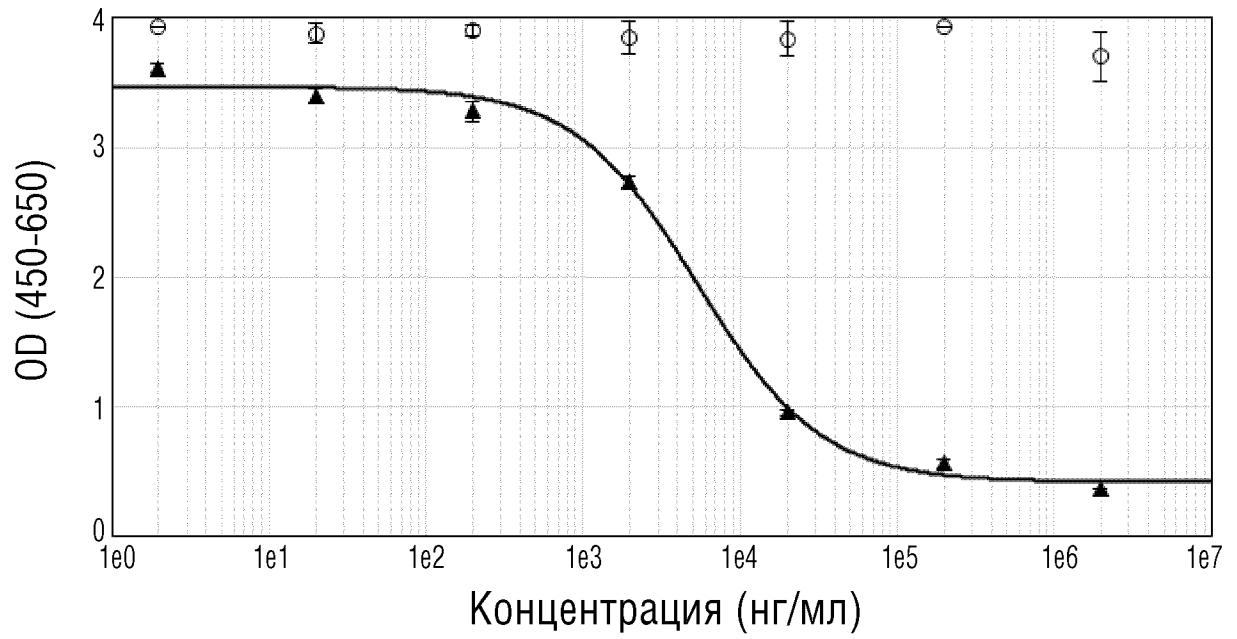
ФИГ.3



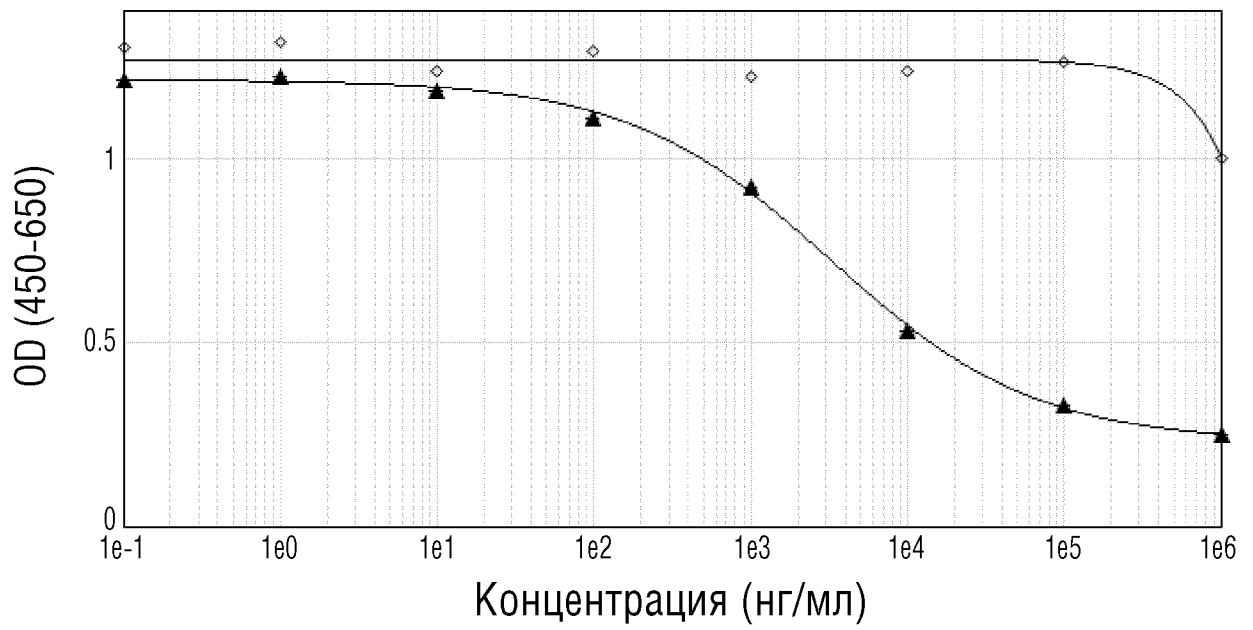
ФИГ.4



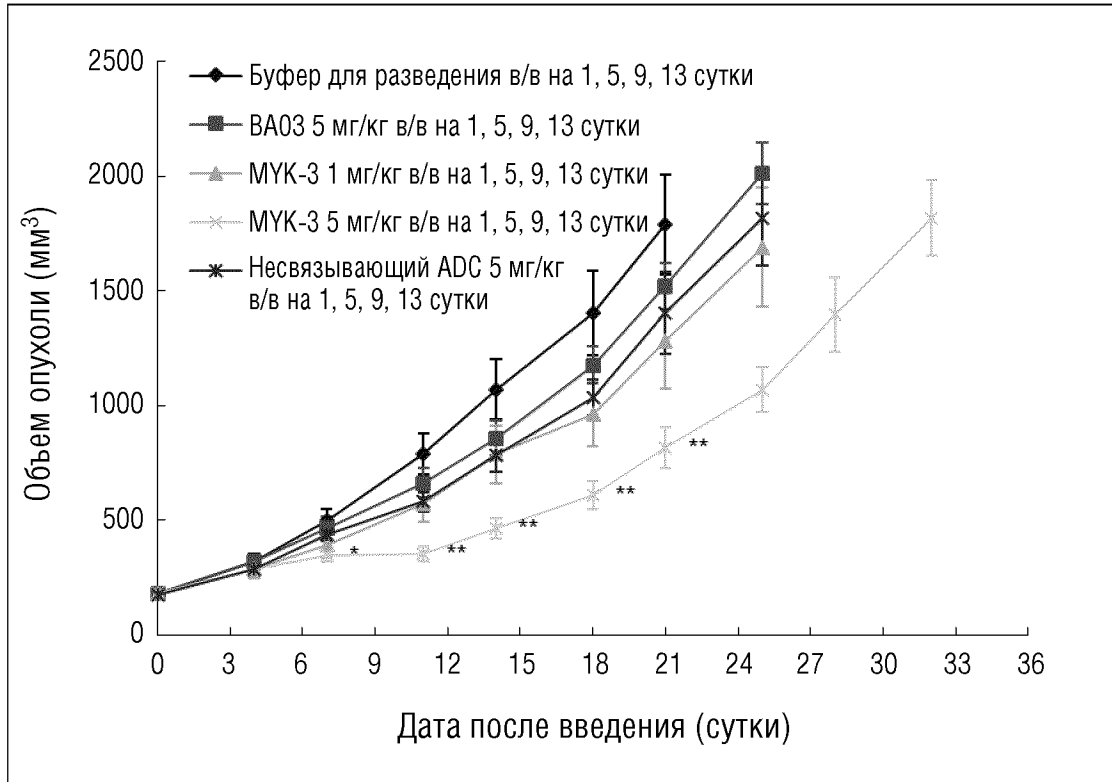
ФИГ.5



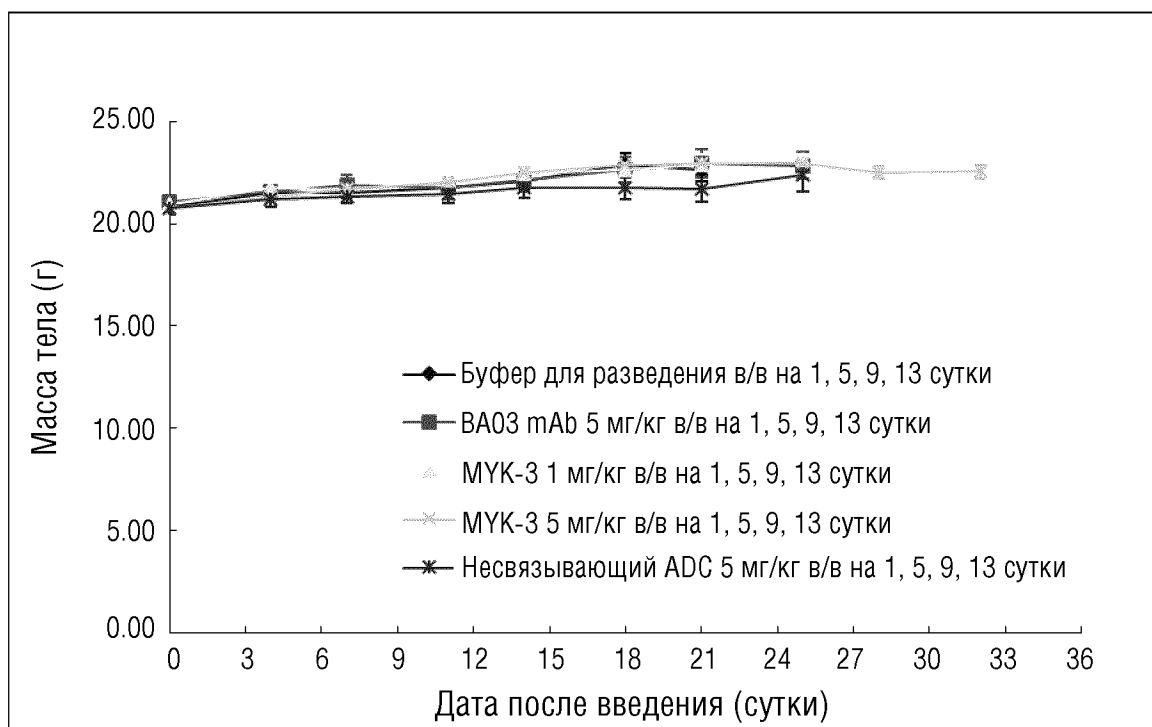
ФИГ.6



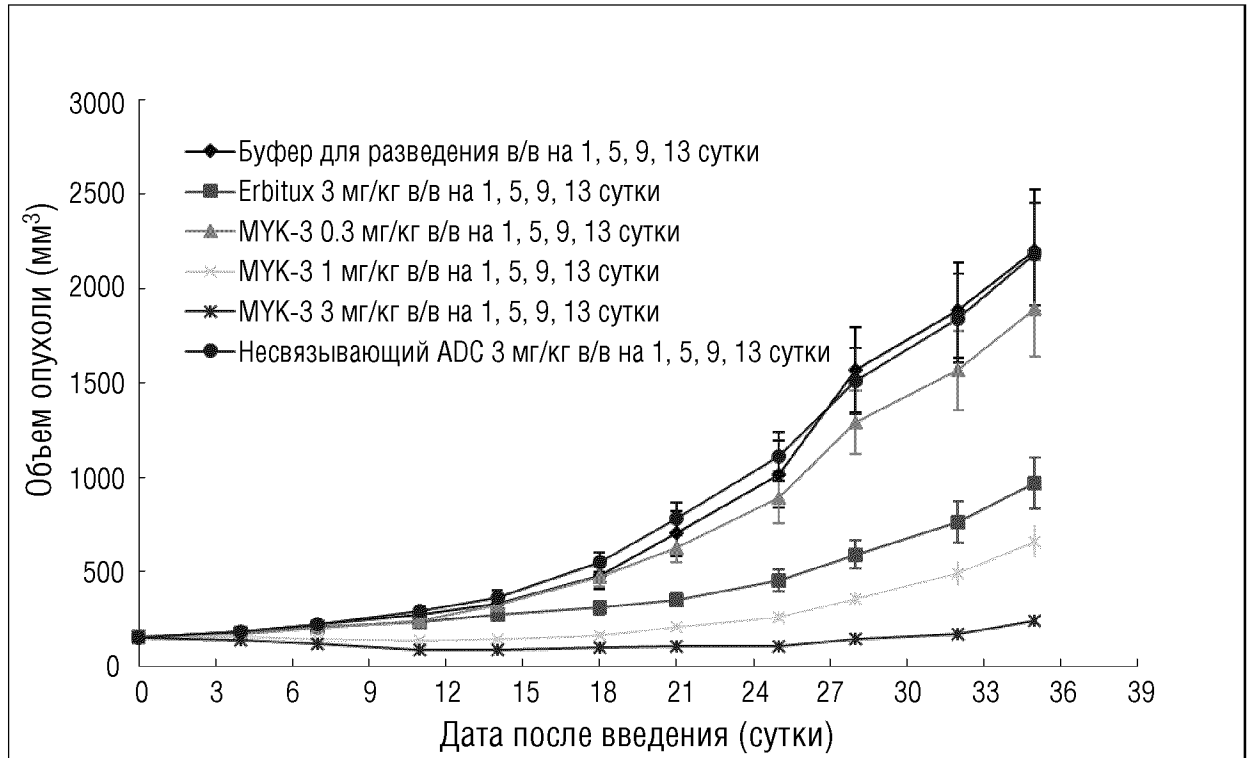
ФИГ.7



ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10

