



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110433139 A

(43)申请公布日 2019.11.12

(21)申请号 201910492831.8 *A61K 38/08*(2019.01)

(22)申请日 2014.03.14 *A61K 47/18*(2006.01)

(30)优先权数据 *A61K 47/26*(2006.01)

61/790,490 2013.03.15 US *A61K 47/68*(2017.01)

*A61P 35/00*(2006.01)

(62)分案原申请数据

201480025078.7 2014.03.14

(71)申请人 艾伯维德国有限责任两合公司

地址 德国威斯巴登

申请人 艾伯维公司

(72)发明人 M·彻佩 K·凯勒塔 V·库玛

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

*A61K 9/19*(2006.01)

权利要求书1页 说明书54页

序列表14页 附图9页

(54)发明名称

抗EGFR抗体药物偶联物制剂

(57)摘要

本发明提供包含抗EGFR抗体药物偶联物(ADC)的稳定制剂,其包括与阿里他汀例如MMAF偶联的抗EGFR抗体(如抗体1)、组氨酸、糖和表面活性剂。

1. 一种制剂, 包含抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体药物偶联物 (ADC)、糖、组氨酸和表面活性剂, 其中所述制剂的pH为约5-7, 且其中所述抗EGFR ADC包含与阿里他汀偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分。

2. 权利要求1所述的制剂, 其中所述阿里他汀是单甲基阿里他汀F (MMAF)。

3. 权利要求2所述的制剂, 其中所述MMAF通过马来酰亚胺基己酰基接头与所述抗体偶联。

4. 权利要求1-3任一项所述的制剂, 其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯或泊洛沙姆。

5. 权利要求4所述的制剂, 其中所述制剂包含0.05-0.15mg/ml的聚山梨醇酯。

6. 权利要求4或5所述的制剂, 其中所述聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80。

7. 权利要求1-6任一项所述的制剂, 其中所述制剂包含约1-40mg/ml的抗EGFR ADC。

8. 权利要求1-7任一项所述的制剂, 其中所述制剂包含约60-80mg/ml的糖。

9. 权利要求1-8任一项所述的制剂, 其中所述糖选自甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖和海藻糖。

10. 权利要求1-9任一项所述的制剂, 包含约5-25mM组氨酸。

## 抗EGFR抗体药物偶联物制剂

[0001] 本申请是申请日为2014年03月14日和发明名称为“抗EGFR抗体药物偶联物制剂”的201480025078.7号发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2013年3月15日提交的美国临时申请号61/790,490的权益。前述优先权文件的内容通过引用全部并入本文。

### 背景技术

[0004] 人表皮生长因子受体(也称为HER-1或Erb-B1,且在本文中称为“EGFR”)是由c-erbB原癌基因编码的170kDa的跨膜受体,并显示内在酪氨酸激酶活性(Modjtahedi等, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996); Herbst和Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002))。SwissProt数据库登录号P00533提供EGFR的序列。EGFR通过酪氨酸激酶介导的信号转导通路调节多种细胞过程,包括但不限于控制细胞增殖、分化、细胞存活、细胞凋亡、血管生成、有丝分裂和转移的信号转导通路的激活(Atalay等, Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Tsao和Herbst, Signal 4:4-9 (2003); Herbst和Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi等, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996))。

[0005] 在多种人恶性疾病(包括膀胱、脑、头颈、胰腺、肺、乳腺、卵巢、结肠、前列腺和肾的癌症)中已经报道了EGFR的过表达(Atalay等, Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Herbst和Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi等, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996))。在很多这样的情况下,EGFR的过表达与患者的较差预后相关或关联(Herbst和Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi等, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996))。EGFR也在正常组织的细胞中表达,尤其是在皮肤、肝脏和胃肠道的表皮组织中,尽管其表达水平通常低于在恶性细胞中的表达水平(Herbst和Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002))。

[0006] 包含EGFR基因扩增(即多拷贝的EGFR基因)的显著比例的肿瘤也共表达截断形式的受体(Wikstrand等(1998) J. Neurovirol. 4, 148-158),其称为de2-7 EGFR、 $\Delta$ EGFR或 $\Delta$ 2-7(在此互换使用的术语)(Olapade-Olaopa等(2000) Br. J. Cancer. 82, 186-94)。在de2-7EGFR中发现的重排导致缺少跨越外显子2-7的801个核苷酸的框内成熟mRNA(Wong等(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 2965-9; Yamazaki等(1990) Jpn. J. Cancer Res. 81, 773-9; Yamazaki等(1988) Mol. Cell. Biol. 8, 1816-20; Sugawa等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 8602-6)。对应的EGFR蛋白具有267个氨基酸的缺失(包括胞外域的残基6-273)和在融合接合点的新甘氨酸残基(Sugawa等, 1990)。这种缺失与甘氨酸残基的插入一起在缺失界面处产生了独特的接合肽(Sugawa等, 1990)。

[0007] 在包括神经胶质瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌和前列腺癌的多种肿瘤类型中已经报道了de2-7 EGFR(Wikstrand等(1997) Cancer Res. 57, 4130-40; Olapade-Olaopa等(2000) Br. J. Cancer. 82, 186-94; Wikstrand等(1995) Cancer Res. 55, 3140-8; Garcia de Palazzo等(1993) Cancer Res. 53, 3217-20)。虽然该截断的受体不结合配体,它具有较低的固有活性,且对于在裸鼠中作为肿瘤外植体生长的神经胶质瘤细胞赋予显著的生长优势

(Nishikawa等(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91,7727-31),并且能够转化NIH3T3细胞(Batra等(1995)Cell Growth Differ.6,1251-9)和MCF-7细胞。在神经胶质瘤细胞中de2-7 EGFR采用的细胞机制还没有被完全确定,但据报道包括细胞凋亡的减少(Nagane等(1996)Cancer Res.56,5079-86)和少量增殖强化(Nagane等,1996)。

[0008] 因为该截断受体的表达限于肿瘤细胞,它代表抗体疗法的一个高特异性的靶标。因此,本领域需要能够为需要它们的那些受试者提供有效治疗的抗EGFR抗体和制剂。

[0009] 抗体药物偶联物(ADC)代表包含通过化学接头偶联至细胞毒性药物的抗体的一类新治疗剂。目前临床试验正在测试大量ADC,包括曲妥珠单抗(与DM1相连的赫赛汀(抗HER2抗体;Genentech/Roche)和glembatumumab vedotin(CDX-011;与MMAE相连的抗GPNMB抗体;Celldex Therapeutics)。ADC的治疗理念是利用作为媒介把抗体通过结合靶表面抗原的方式将细胞毒性药物递送至肿瘤细胞。ADC具有比未偶联抗体更复杂的异质的结构。因此,ADC对用于治疗目的的制剂提出了挑战。

## 发明内容

[0010] 本发明提供包含抗体-药物偶联物(ADC)的制剂以及涉及使用此类偶联物来治疗需要用抗表皮生长因子受体(抗EGFR)ADC治疗的疾病例如癌症的方法。

[0011] 本发明提供一种包含抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体药物偶联物(ADC)、糖、组氨酸和表面活性剂的制剂,其中所述制剂的pH为约5-7,和其中所述抗EGFR ADC包含与阿里他汀偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分。

[0012] 本发明提供一种包含抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体药物偶联物(ADC)、糖、琥珀酸或柠檬酸和/或磷酸盐缓冲剂和表面活性剂的制剂,其中所述制剂的pH为约5-7,和其中所述抗EGFR ADC包含与阿里他汀偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分。在一个实施方案中,制剂是冻干的。

[0013] 在一个实施方案中,制剂包含的表面活性剂是聚山梨醇酯,如聚山梨醇酯80,或泊洛沙姆。在一个实施方案中,制剂包含0.05-0.15mg/ml聚山梨醇酯。

[0014] 在另一个实施方案中,制剂包含约60-80mg/ml的糖。在一个实施方案中,糖选自甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖和海藻糖。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含约5-25nM的组氨酸。

[0016] 在另一个进一步的实施方案中,制剂是冻干的。在一个实施方案中,制剂是冻干的且糖是蔗糖。在本发明的另一个实施方案中,冻干的制剂不包含乳糖酸。在本发明的另一个实施方案中,冻干的制剂不包含糖酸。

[0017] 在一个实施方案中,本发明的制剂是水性的,且包含约1-40mg/ml的抗EGFR ADC。

[0018] 在进一步的实施方案中,本发明的制剂包含1-150mg的抗EGFR ADC。在一个实施方案中,本发明的制剂包含90-110mg的抗EGFR ADC。

[0019] 在一个实施方案中,本发明制剂的pH为约5-7。在进一步的实施方案中,制剂的pH为约5.5-6.5。

[0020] 在一个实施方案中,阿里他汀是单甲基阿里他汀F(MMAF)。在一个实施方案中,本发明的制剂包含含有与单甲基阿里他汀F(MMAF)偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗EGFR ADC。在另一个实施方案中,MMAF通过马来酰亚胺基己酰基接头与抗体偶联。

[0021] 本发明进一步提供包含含有与阿里他汀偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体药物偶联物 (ADC)、糖 (例如蔗糖)、表面活性剂 (例如聚山梨醇酯, 如聚山梨醇酯80) 和组氨酸的冻干制剂。在一个实施方案中, 冻干制剂包含1-20mg的组氨酸, 约320-410mg的糖、约0.1-0.9mg的表面活性剂和约1-150mg的抗EGFR ADC。

[0022] 本发明还提供包含约1-100mg/ml的含有与阿里他汀偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体药物偶联物 (ADC)、约1-10mg/ml的组氨酸、约50-90mg/ml的糖 (例如蔗糖) 和约0.01-0.2mg/ml的表面活性剂 (例如聚山梨醇酯80) 的水性制剂。

[0023] 在一个实施方案中, 本发明的制剂包含抗EGFR ADC, 其中所述抗EGFR抗体是人源化的。

[0024] 在另一个实施方案中, 本发明的制剂包含抗EGFR ADC, 其中所述抗EGFR抗体包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0025] 在另一个实施方案中, 本发明的制剂包含抗EGFR ADC, 其中所述抗EGFR抗体包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链可变区、具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0026] 在进一步的实施方案中, 本发明的制剂包含抗EGFR ADC, 其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 该重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区 (CDR), 且该轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR。

[0027] 在本发明的另一个实施方案中, 抗EGFR ADC包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列中所示的轻链可变区中所述的CDR (即轻链CDR1、CDR2和CDR3) 和SEQ ID NO:13的氨基酸序列中所述的CDR (即重链CDR1、CDR2和CDR3)。

[0028] 本发明进一步提供包含蔗糖、聚山梨醇酯80和组氨酸的冻干制剂, 且其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 该重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区 (CDR), 且该轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR。在一个实施方案中, 制剂包含1-110mg的抗EGFR ADC。

[0029] 在一个实施方案中, 本发明的制剂包括含有平均DAR为约3的抗EGFR ADC的ADC混合物, 或含有DAR为约2-4的抗EGFR ADC的ADC混合物。

[0030] 在一个实施方案中, 本发明的制剂包含含有与单甲基阿里他汀F (MMAF) 偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗EGFR ADC、蔗糖、组氨酸和聚山梨醇酯80, 其中所述ADC 1-MMAF包含重链可变区和轻链可变区, 该重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区 (CDR), 且该轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR, 其中所述制剂包含平均DAR为约3的ADC混合物或DAR为约2-4的ADC混合物。在本发明的进一步实施方案中, 制剂是冻干的。还在进一步的发明中, 抗EGFR抗体通过马来酰亚胺基己酰基接头与MMAF偶联。还在进一步的实施方案中, 抗EGFR抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0031] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含含有与单甲基阿里他汀E (MMAE) 偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗EGFR ADC、蔗糖、组氨酸和聚山梨醇酯80,其中所述ADC 1-MMAE包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR),且该轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR,其中所述制剂包含平均DAR为约3的ADC混合物或DAR为约2-4的ADC混合物。在本发明的进一步实施方案中,制剂是冻干的。还在进一步的实施方案中,抗EGFR抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0032] 在一个实施方案中,本发明的制剂是药物制剂。

[0033] 本发明还涉及制备制剂的方法,其中所述方法包括将pH范围为约5-7且包含1-20mg的组氨酸、约320-410mg的糖、约0.1-0.9mg的表面活性剂和约1-150mg的抗EGFR ADC的水性制剂冻干。

[0034] 本发明进一步提供治疗受试者的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的制剂的抗EGFR ADC,其中所述受试者患有需要用抗EGFR ADC治疗的疾病。在一个实施方案中,所述需要用抗EGFR ADC治疗的疾病是癌症,例如胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、鳞状细胞癌、肛门癌、皮肤癌和外阴癌。

[0035] 在一个实施方案中,本发明的制剂用于治疗可能过表达表皮生长因子受体(EGFR)的实体肿瘤或鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0036] 在一个实施方案中,本发明的制剂用于治疗选自鳞状肿瘤(包括肺、头颈、宫颈等的鳞状肿瘤)、胶质母细胞瘤、胶质瘤、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、鳞状细胞癌、肛门癌、皮肤癌和外阴癌的癌症。

[0037] 在一个实施方案中,本发明的制剂用于治疗多形性胶质母细胞瘤。

[0038] 在一个实施方案中,本发明的制剂用于治疗具有EGFR过表达的实体肿瘤。在一个实施方案中,本发明的制剂用于治疗患有可能过表达EGFR的晚期实体肿瘤的受试者。

[0039] 在一个实施方案中,本发明的制剂静脉内施用。

[0040] 本发明还提供包括在此所述的制剂的试剂盒。

[0041] 具体地,本发明涉及以下各项:

[0042] 1. 一种制剂,包含抗表皮生长因子受体(EGFR) 抗体药物偶联物(ADC)、糖、组氨酸和表面活性剂,其中所述制剂的pH为约5-7,且其中所述抗EGFR ADC包含与阿里他汀偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分。

[0043] 2. 第1项所述的制剂,其中所述阿里他汀是单甲基阿里他汀F(MMAF)。

[0044] 3. 第2项所述的制剂,其中所述MMAF通过马来酰亚胺基己酰基接头与所述抗体偶联。

[0045] 4. 第1-3项任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯或泊洛沙姆。

[0046] 5. 第4项所述的制剂,其中所述制剂包含0.05-0.15mg/ml的聚山梨醇酯。

[0047] 6. 第4或5项所述的制剂,其中所述聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80。

[0048] 7. 第1-6项任一项所述的制剂,其中所述制剂包含约1-40mg/ml的抗EGFR ADC。

[0049] 8. 第1-7项任一项所述的制剂,其中所述制剂包含约60-80mg/ml的糖。

[0050] 9. 第1-8项任一项所述的制剂,其中所述糖选自甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖和海藻

糖。

[0051] 10. 第1-9项任一项所述的制剂, 包含约5-25mM组氨酸。

[0052] 11. 第1-10项任一项所述的制剂, 其中所述制剂的pH为约5.5-6.5。

[0053] 12. 第1-11项任一项所述的制剂, 其中所述制剂是冻干的。

[0054] 13. 第1-3项任一项所述的制剂, 其中所述制剂是冻干的, 且所述糖是蔗糖。

[0055] 14. 第13项所述的制剂, 其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯。

[0056] 15. 第14项所述的制剂, 其中所述聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80。

[0057] 16. 第1-3项任一项所述的制剂, 其中所述制剂是包含约1-100mg/ml的抗EGFR ADC、约1-10mg/ml的组氨酸、约50-90mg/ml的糖和约0.01-0.2mg/ml的表面活性剂的水性制剂。

[0058] 17. 第16项所述的制剂, 其中所述糖是蔗糖。

[0059] 18. 第16或17项所述的制剂, 其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0060] 19. 第16-18项任一项所述的制剂, 其中所述制剂的pH为约5.5-6.5。

[0061] 20. 第16-19项任一项所述的制剂, 包含1-150mg/ml的抗EGFR ADC。

[0062] 21. 第20项所述的制剂, 包含1-40mg/ml的抗EGFR ADC。

[0063] 22. 第1-21项任一项所述的制剂, 其中所述抗体是人源化的。

[0064] 23. 第1-22项任一项所述的制剂, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0065] 24. 第1-22项任一项所述的制剂, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR), 且所述轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR。

[0066] 25. 第1-3项任一项所述的制剂, 其中所述制剂是包含蔗糖、聚山梨醇酯80和组氨酸的冻干制剂, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)的重链可变区, 且所述轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR的轻链可变区。

[0067] 26. 第25项所述的制剂, 包含1-120mg的抗EGFR ADC。

[0068] 27. 第1-26项任一项所述的制剂, 其中所述制剂包含平均DAR为约3的ADC混合物或DAR为约2-4的ADC混合物。

[0069] 28. 一种制剂, 包含:

[0070] 抗EGFR ADC, 其包含与单甲基阿里他汀F(MMAF)偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分, 其中所述ADC 1-MMAF重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR), 且所述轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR;

[0071] 蔗糖;

[0072] 组氨酸; 和

[0073] 聚山梨醇酯80;

- [0074] 其中所述制剂包含平均DAR为约3的ADC混合物或DAR为约2-4的ADC混合物。
- [0075] 29. 第28项所述的制剂, 其是冻干的。
- [0076] 30. 第28或29项所述的制剂, 其中所述抗EGFR抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0077] 31. 第1-30项任一项所述的制剂, 其是药物制剂。
- [0078] 32. 制备如第1-3项任一项或第29项所述的制剂的方法, 所述方法包括将pH为约5-7且包含1-20mg组氨酸、约320-410mg糖、约0.1-0.9mg表面活性剂和约1-150mg所述抗EGFR ADC的水性制剂冻干。
- [0079] 33. 治疗受试者的方法, 包括向所述受试者施用治疗有效量的如第1-31项任一项所述的制剂, 其中所述受试者患有需要用抗EGFR ADC治疗的疾病。
- [0080] 34. 第33项所述的方法, 其中所述需要用抗EGFR ADC治疗的疾病是癌症。
- [0081] 35. 第34项所述的方法, 其中所述癌症选自胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、鳞状细胞癌、肛门癌、皮肤癌和外阴癌。
- [0082] 36. 第34项所述的方法, 其中所述癌症选自鳞状肿瘤、胶质母细胞瘤、胶质瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、肛门癌、皮肤癌和外阴癌。
- [0083] 37. 第36项所述的方法, 其中所述鳞状肿瘤选自肺鳞状肿瘤、头或颈的鳞状肿瘤和宫颈鳞状肿瘤。
- [0084] 38. 第34项所述的方法, 其中所述癌症是具有EGFR过表达的实体肿瘤。
- [0085] 39. 第33-38项任一项所述的方法, 其中所述制剂静脉内施用。
- [0086] 40. 一种试剂盒, 包含如第1-29项任一项所述的制剂。

## 附图说明

- [0087] 图1是显示通过接头与目标抗体 (mAb) 偶联的MMAE的结构 (GN接头+阿里他汀: vcMMAE) 的示意图。
- [0088] 图2是显示通过接头与目标抗体 (mAb) 偶联的MMAF的结构 (接头+阿里他汀: mcMMAF) 的示意图。
- [0089] 图3 (A和B) 通过图表描绘如用动态扫描荧光法 (A) 和差示扫描量热法 (B) 测定的展开温度的开始。◆抗体1; ■抗体药物偶联物 (ADC) 1-MMAF; ▲ADC1-MMAE。
- [0090] 图4 (A和B) 通过图表描绘用傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) (A) 和近UV-圆二色性 (CD) (B) 测得的在抗体1、ADC 1-MMAF和ADC 1-MMAE中非结构化元素的存在。◆抗体1; ■ADC1-MMAF; ▲ADC1-MMAE。
- [0091] 图5通过图表描绘与ADC 1-MMAF和抗体1相比, 低浓度的ADC1-MMAE的聚集倾向。
- [0092] 图6通过图表描绘与ADC 1-MMAF和抗体1相比, 高浓度的ADC1-MMAE的聚集倾向。
- [0093] 图7是血清稳定性分析的示意图, 并描述了多种分子 (包括抗体1、ADC 1-MMAF和ADC 1-MMAE) 的体外血清稳定性。
- [0094] 图8 (A和B) 通过图表描绘如用SEC测定的在pH 5.75的15mM组氨酸缓冲液中 (A) 和在1mg/ml pH 7.0的10mM柠檬酸和10mM磷酸缓冲液中抗体1、ADC 1-MMAF和ADC 1-MMAE制剂的冻/融稳定性 (以存在的单体百分比表示)。

[0095] 图9 (A和B) 是在冻融期间用微流成像 (MFI) 测定的量化显微 (subvisible) 颗粒形成的图表。

## 具体实施方式

### [0096] I. 定义

[0097] 为了使本发明更容易理解, 首先定义一些术语。此外, 应当注意, 当提及参数的数值或数值范围时, 在所述数值中间的数值和范围也意欲是本发明的部分。

[0098] 在此可互换使用的术语“抗表皮生长因子抗体药物偶联物”或“抗EGFR抗体药物偶联物”和“抗EGFR ADC”是指包含与EGFR特异性结合的抗体的抗体药物偶联物, 其中所述抗体与药物例如细胞毒性剂如阿里他汀 (例如单甲基阿里他汀F) 偶联。在一个实施方案中, 抗EGFR抗体药物偶联物是ADC1-MMAF, 其为通过马来酰亚胺基己酰基 (mc) 连接与MMAF偶联的抗体1。SEQ ID NO: 13和22提供对应于抗体1的轻链和重链的氨基酸序列。除非另有说明, 在此所用的术语“ADC1-MMAF”包括纯化的ADC1-MMAF (也称为ADC1-MMAF<sub>p</sub>)。

[0099] 如在此所用, 术语“阿里他汀”是指一个抗有丝分裂剂的家族。阿里他汀衍生物也包括于术语“阿里他汀”的定义之内。阿里他汀的实例包括但不限于, 阿里他汀E (AE)、单甲基阿里他汀E (MMAE)、单甲基阿里他汀F (MMAF) 和多拉司他汀的合成类似物。

[0100] 术语“抗EGFR抗体”意欲指与EGFR特异性结合的抗体。与目标抗原即EGFR“结合”的抗体是能够以足够的亲和性与抗原结合的抗体, 从而使该抗体可用于靶向表达该抗原的细胞。

[0101] 如在此所用, 术语“ADC混合物”是指包含ADC的多相DAR分布的组合物。在一个实施方案中, ADC混合物包含DAR分布为1-8, 例如2、4、6和8 (即, 2、4、6和8的载药种类 (drug loaded species)) 的抗EGFR ADC。在另一个实施方案中, ADC混合物包含DAR小于4, 例如DAR为2-4的抗EGFR ADC。值得注意的是, 降解产物可能使1、3、5和7的DAR也包含于混合物中。此外, 混合物中ADC的DAR也可以超过8。ADC混合物由链间二硫键还原然后偶联获得。

[0102] 如在此所用, 术语“ADC1-MMAF<sub>p</sub>”是指在ADC混合物中发现的已经纯化的ADC1-MMAF分子, 使得ADC的DAR在期望范围内, 例如 (DAR为2-4), 或该ADC包含于具有期望平均值 (例如平均DAR为3) 的ADC混合物中。

[0103] 如在此所用, 术语“制剂”意欲指水性制剂或冻干制剂。在一个实施方案中, 本发明的制剂是冻干的。在一个实施方案中, 本发明的制剂是水性的。在一个实施方案中, 本发明的制剂不包含螯合剂。在一个实施方案中, 本发明的冻干制剂不包含螯合剂。

[0104] 术语“水性制剂”是指其中溶剂是水的溶液。在一个实施方案中, “水性制剂”是指其中溶剂是水的液体制剂, 其中所述制剂之前没有冻干 (即不是由冻干制剂的重构形成)。在另一个实施方案中, “水性制剂”是指其中溶剂是水的液体制剂, 其中所述制剂之前被冻干 (即, 重构的制剂)。

[0105] 如在此所用的与本发明制剂相关的术语“冻干的”是指通过冷冻制剂和随后通过本领域已知的任何冷冻干燥方法 (例如可商购的冷冻干燥设备) 从冷冻物将冰升华来进行干燥的制剂。

[0106] “重构的”制剂是通过将包含蛋白例如ADC的冻干制剂溶解在稀释剂中使得蛋白质分散在重构制剂中来制备的制剂。重构制剂适于向待用目标蛋白 (例如抗EGFR抗体药物偶

联物)治疗的受试者施用(例如静脉内施用)。

[0107] 在此的目标“稀释剂”是药理学上可接受的(对施用于人安全且无毒的)且可用于制备液体制剂(例如冻干后重构的制剂)的稀释剂。示范性稀释剂包括无菌水、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液。在替代的实施方案中,稀释剂可以包括盐和/或缓冲剂的水溶液。

[0108] 术语“缓冲剂”是指当在溶液中时通过其酸-碱共轭成分的作用抵抗pH变化的化合物。在一个实施方案中,本发明中所用的缓冲剂的pH范围为约4.5至约7.5。将控制pH在这个范围内的缓冲剂的实例包括醋酸盐(例如醋酸钠)、琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、葡萄糖酸、蛋氨酸、咪唑、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、柠檬酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐、Tris及其他有机酸缓冲剂。在一个实施方案中,制剂中所用的缓冲剂包含组氨酸、琥珀酸盐或者柠檬酸盐或磷酸盐缓冲剂。在本发明的一个实施方案中,制剂包含约1-10mg/mL的缓冲剂(包含组氨酸)。在本发明的另一个实施方案中,制剂包含1-20mg的缓冲剂(包含组氨酸)。

[0109] 如在此所用,术语“糖”意指指单糖或寡糖。单糖是不可被酸水解的单体糖,包括单糖及其衍生物,例如氨基糖。单糖的实例包括但不限于,葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、山梨糖、核糖、脱氧核糖、神经氨酸。寡糖是直链或支链的由通过糖苷键相连的多于一个单体糖单元组成的糖。寡糖中的单体糖单元可以相同或不同。取决于单体糖单元的数量,寡糖是二糖、三糖、四糖、五糖等等。寡糖的实例包括但不限于,麦芽糖、蔗糖、乳糖、松三糖、海藻糖、山梨糖和棉子糖。与多糖不同,单糖和寡糖是可溶于水的。糖的实例包括但不限于,还原糖、非还原糖、糖醇和糖酸。“还原糖”是包含游离的醛或酮基的糖,且能够还原金属离子或与蛋白质中的赖氨酸和其他氨基共价反应。“非还原糖”是缺少游离的醛或酮基的糖,且不能被温和氧化剂例如Fehling或Benedict溶液氧化。还原糖的实例有果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。非还原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖和棉子糖。甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、苏糖醇、山梨糖醇和甘油是糖醇的实例。在本发明的一个实施方案中,糖是甘露糖、山梨糖醇、蔗糖或海藻糖。在本发明的另一个实施方案中,制剂包含约50-90mg/mL的糖,例如蔗糖。在本发明的另一个进一步的实施方案中,制剂包含约60-80mg/mL的糖,例如蔗糖。在本发明的另一个进一步的实施方案中,制剂包含约70mg/mL的糖,例如蔗糖。还在本发明的另一个进一步的实施方案中,冻干制剂包含约320-410mg的糖。

[0110] 术语“表面活性剂”通常是指具有两性结构的有机物质;即它们由具有相反溶解性倾向的基团组成,一般是油溶性烃链和水溶性离子基团。根据表面活性部分的电荷,表面活性剂可以分为阴离子型、阳离子型和非离子型表面活性剂。表面活性剂经常用作各种药物组合物和生物材料制剂的润湿剂、乳化剂、增溶剂和分散剂。合适的表面活性剂的实例包括但不限于,月桂基硫酸钠、聚山梨醇酯如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯、单月桂酸酯、单棕榈酸酯、单硬脂酸酯或聚氧乙烯山梨聚糖的另一种酯(例如可商购的TWEEN,例如TWEEN20和TWEEN80(ICI Speciality Chemicals))、二辛基磺酸琥珀酸钠(DOSS)、卵磷脂、硬脂醇、鲸蜡硬脂醇、胆固醇、聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯脂肪酸甘油酯、泊洛沙姆(例如,作为环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物的Pluronic F68<sup>TM</sup>和F108<sup>TM</sup>);聚氧乙烯蓖麻油衍生物或其混合物。

[0111] 如在此所用,术语“聚山梨醇酯”是指山梨糖醇的油酸酯及其酸酐,通常与环氧乙

烯共聚。在一个实施方案中,聚山梨醇酯的分子量范围为约1200Da (大致是聚山梨醇酯20的分子量) 至约1350Da (大致是聚山梨醇酯80的分子量)。在一个实施方案中,制剂包含聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60或聚山梨醇酯80。在一个实施方案中,制剂包含约0.1-0.9mg聚山梨醇酯。在另一个实施方案中,制剂包含约0.01-0.2mg/ml聚山梨醇酯。在另一个实施方案中,制剂包含约0.05-0.15mg/ml聚山梨醇酯。

[0112] 术语“药物制剂”是指处于允许活性成分的生物活性有效且因此可以施用于受试者用于治疗用途的形式的制剂。

[0113] “稳定的”制剂是其中抗EGFR抗体药物偶联物在储存中基本上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。用于测量蛋白稳定性的各种分析技术是本领域可得的,且综述于例如Peptide and Protein Drug Delivery, pp.247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 和 Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90中。在一个实施方案中,抗EGFR抗体药物偶联物的稳定性根据溶液中单体蛋白质的百分比测定,具有低百分比的降解(例如片段化)的和/或聚集的蛋白质。例如,包含稳定的抗EGFR抗体药物偶联物的制剂可以包括至少95%的单体抗EGFR抗体药物偶联物。或者,制剂可以包括不超过5%的聚集的和/或降解的抗EGFR抗体药物偶联物。

[0114] 如果在肉眼检查颜色和/或澄清度时或如用UV光散射或尺寸排阻色谱法测量的,抗EGFR抗体药物偶联物基本上没有显示聚集、沉淀和/或变性的迹象,则其在药物制剂中“保持其物理稳定性”。在一个实施方案中,稳定的水性制剂是制剂中具有少于5%的抗EGFR抗体药物偶联物聚集的制剂。

[0115] 如果抗EGFR抗体药物偶联物在给定时间的化学稳定性使得其被认为仍然保留如下定义的其生物活性,则其在药物制剂中“保持其化学稳定性”。可以通过检测或定量抗EGFR抗体药物偶联物的化学改变的形式来评估化学稳定性。化学改变可以涉及例如可用尺寸排阻色谱法、SDS-PAGE和/或基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI/TOF MS)评估的大小变化(例如剪裁)。化学改变的其他类型包括例如可用离子交换色谱法评估的电荷变化(例如,作为脱酰胺反应的结果发生)。

[0116] 如果药物制剂中的蛋白质对于其预期目的是生物活性的,则抗EGFR抗体药物偶联物在药物制剂中“保持其生物稳定性”。例如,如果药物制剂中的抗EGFR抗体药物偶联物的生物活性是在药物制剂制备时具有的生物活性的约30%、约20%或约10%之内(在试验误差之内)(例如用抗原结合试验测定的),则抗EGFR抗体药物偶联物的生物活性被保持。在一个实施方案中,生物活性是对表皮样癌细胞的细胞毒性。

[0117] 术语“抗体”广义地是指通常由四条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的免疫球蛋白(Ig)分子,或保留Ig分子的必要靶标结合特征的任何功能性片段、突变体、变体或衍生物。

[0118] 在全长抗体中,每条重链由重链可变区(在此缩写为HCVR或VH)和重链恒定区组成。重链恒定域由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在此缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定域由一个结构域CL组成。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其穿插于更保守的区域(称为框架区(FR))。各VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)和类别(例如IgG1、IgG2、

IgG 3、IgG4、IgA1和IgA2) 或子类。

[0119] 如在此所用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)是指保持抗体特异性结合抗原(例如hIL-13)的能力的一个或多个抗体片段。已经表明抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段执行。此类抗体实施方案也可以是双特异性、双重特异性或多特异性形式;特异性与两个或多个不同抗原结合。术语抗体的“抗原结合部分”涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 包含单个可变结构域的dAb片段(Ward等,(1989) *Nature* 341:544-546, Winter等, PCT公开W0 90/05144 A1, 在此通过引用并入本文);和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头将它们接合,使它们能够形成其中VL和VH区配对以形成单价分子的单个蛋白链(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。术语抗体的“抗原结合部分”也意欲包含此类单链抗体。还包含单链抗体的其他形式,例如双体。双体是二价的双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单一多肽链上表达,但使用过短而不能使在同一条链上的两个结构域之间配对的接头,因此迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点(参见例如 Holliger, P. 等(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J. 等(1994) *Structure* 2:1121-1123)。此类抗体结合部分是本领域已知的(Kontermann和Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790pp. (ISBN 3-540-41354-5))。

[0120] 如在此所用,“分离的抗体”意欲指基本上不含有具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合EGFR的分离的抗体基本上不含有特异性结合EGFR之外的抗原的抗体)。然而,特异性结合EGFR的分离的抗体可以对其他抗原例如来自其他物种的EGFR分子具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含有其他细胞物质和/或化学物质。

[0121] 术语“人源化抗体”是指包含来自非人物种(例如小鼠)的重链和轻链可变区,但其中至少一部分VH和/或VL序列已经被改变成更加“人样”(即与人种系可变序列更加相似)的抗体。在一个具体的实施方案中,术语“人源化抗体”是指特异性结合目标抗原且包含实质上具有人抗体的氨基酸序列的框架(FR)区和包含实质上具有非人抗体的氨基酸序列的CDR的抗体或者抗体变体、衍生物或片段。如在此所用,在CDR的情况下,术语“实质上”是指与非人抗体CDR具有至少80%、优选至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列的CDR。在一个实施方案中,人源化抗体的一种类型是CDR移植抗体,其中将人CDR序列引入非人VH和VL序列中以替换对应的非人CDR序列。

[0122] 如在此所用,术语“CDR”是指在抗体可变序列内的互补决定区。在重链和轻链的各个可变区中有三个CDR,对于各个可变区命名为CDR1、CDR2和CDR3。如在此所用,术语“CDR组”是指存在于能够结合抗原的单个可变区内的三个CDR的组。这些CDR的精确边界根据不同系统有不同定义。由Kabat描述的系统(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991)) 不仅提供了可适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,还提供了限定三个CDR的精确残基边界。这些CDR可以称为Kabat CDR。Chothia和他的同事(Chothia等,

J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 和 Chothia 等, Nature 342:877-883 (1989)) 发现 Kabat CDR 内的某些子部分采取几乎相同的肽骨架构象, 尽管其在氨基酸序列水平上具有很大的多样性。这些子部分被命名为 L1、L2 和 L3 或 H1、H2 和 H3, 其中“L”和“H”分别是指轻链和重链区域。这些区域可以称为 Chothia CDR, 其具有与 Kabat CDR 重叠的边界。Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) 和 MacCallum (J Mol Biol 262 (5):732-45 (1996)) 描述了限定与 Kabat CDR 重叠的 CDR 的其他边界。还有其他的 CDR 边界定义可能没有严格遵循以上系统之一, 但仍将与 Kabat CDR 重叠, 尽管它们可能根据特定的残基或残基组或甚至整个 CDR 不显著影响抗原结合的预测或实验发现而被缩短或延长。在此所用的方法可以使用根据这些系统中任一个定义的 CDR, 尽管优选的实施方案使用 Kabat 或 Chothia 定义的 CDR。

[0123] 术语“疾病”是指可以从用本发明制剂的治疗中受益的任何状况, 即需要用制剂中的抗 EGFR 抗体治疗的疾病。这包括慢性和急性疾病, 包括使受试者易感所讨论的疾病的那些病理状况。

[0124] 术语“癌症”意欲指或描述哺乳动物中通常特征是不受调节的细胞生长的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体的实例包括胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、鳞状细胞癌、肛门癌、皮肤癌和外阴癌。在一个实施方案中, 向患有包含 EGFR 基因扩增的肿瘤的患者施用制剂, 从而肿瘤表达截断形式的 EGFR de2-7。在一个实施方案中, 可以向受试者施用包含 ADC1-MMAF 的制剂用于治疗结肠直肠癌、头颈癌 (包括但不限于下咽癌、口咽癌、食管癌、喉癌和口腔癌)、非小细胞肺癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、实体肿瘤 (例如可能过表达表皮生长因子受体 (EGFR) 的实体肿瘤) 或多形性胶质母细胞瘤。

[0125] 如在此所用, 术语“施用”意欲指递送物质 (例如抗 EGFR 抗体药物偶联物) 以达到治疗目的 (例如治疗 EGFR 相关的疾病)。施用方式可以是胃肠外、肠内和局部。胃肠外施用通常是通过注射, 且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0126] 如在此所用, 术语 ADC 的“治疗有效量”或“有效量”是指在预防或治疗或缓解 ADC 治疗有效的疾病的症状中有效的量。

[0127] 术语“治疗”是指治疗性治疗和预防或预防性措施。需要治疗的那些患者包括已经患有疾病的那些和待预防疾病的那些。

[0128] 本发明的各个方面在以下小节中进一步详细描述。

## [0129] II. 本发明的抗 EGFR 抗体药物偶联物制剂

[0130] 本发明涉及包含抗 EGFR 抗体或其抗原结合部分的制剂, 其中所述 EGFR 抗体与一个或多个药物例如阿里他汀 (如 MMAF) 偶联。本发明至少部分地基于以下发现: 将包含抗 EGFR 抗体药物偶联物 (ADC) (其中抗 EGFR 抗体或其抗原结合部分与一个或多个阿里他汀 (例如 MMAF) 分子偶联) 的制剂储存于 5°C 和 25°C 下长达 6 个月之后, 该制剂能够在重构时保留 ADC 的生物活性并在重构后保持药物-抗体比例。

[0131] 在此所述的制剂可以是冻干的或含水的。除非另有说明, 术语“制剂”表示冻干的和含水的两者。

[0132] 某些制剂优选包含抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体药物偶联物 (ADC)、糖、缓冲剂和聚山梨醇酯, 其中所述制剂的 pH 为约 5-7。在某些实施方案中, 制剂进一步包含含有与一

个或多个阿里他汀分子(例如MMAF)偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分(例如抗体1)的抗EGFR ADC。

[0133] 在一个实施方案中,本发明提供包含抗EGFR抗体药物偶联物、糖(例如蔗糖)、表面活性剂(例如聚山梨醇酯,如聚山梨醇酯80)和组氨酸的冻干制剂,其中所述制剂的pH为约5-7,其中所述抗EGFR抗体药物偶联物包含与单甲基阿里他汀F(MMAF)偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分。

[0134] 在一个实施方案中,本发明提供包含抗EGFR抗体药物偶联物、蔗糖、表面活性剂和缓冲剂的冻干制剂,其中所述制剂的pH为约5-7,且其中所述抗EGFR抗体药物偶联物包含通过马来酰亚胺基己酰基接头与单甲基阿里他汀F(MMAF)偶联(mc-MMAF)的抗EGFR抗体或其抗原结合部分,例如抗体1。

[0135] 在一个实施方案中,本发明提供包含抗EGFR抗体药物偶联物、蔗糖、聚山梨醇酯和组氨酸的冻干制剂,其中所述制剂的pH为约5-7,且其中所述抗EGFR抗体药物偶联物包含通过马来酰亚胺基己酰基接头与单甲基阿里他汀F(MMAF)偶联(mc-MMAF)的抗EGFR抗体或其抗原结合部分,例如抗体1。

[0136] 在此所述的制剂优选pH为约4.0至约8.0。在一个实施方案中,制剂的pH范围为约5.0至约7.0;或者pH可以为约5至约6.5;或者制剂的pH可以为约5.5至约6.5。在上述pH值中间的范围,例如约5.6至约6.4,也意欲是本发明的部分。还意欲包括使用任何上述值的组合作为上限/下限的数值范围,例如约5.5至约6.2的pH范围。

[0137] 本发明的制剂优选包含抗EGFR ADC、糖、表面活性剂和缓冲剂。可用于本发明制剂中的本领域已知的缓冲剂的实例包括但不限于醋酸盐、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、磷酸盐、Tris和柠檬酸盐。在一个实施方案中,制剂中所用的缓冲剂是组氨酸。

[0138] 在一个实施方案中,制剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的1-20mg/ml的组氨酸缓冲剂(例如约1至约20、约1至约10、约1至约5、或约1至约3mg/ml)。

[0139] 在一个实施方案中,制剂包含约5-25mM(例如约2至约25mM、约5至约25mM、约10至约25mM或约20至约25mM)及之间的范围的组氨酸。

[0140] 在一个实施方案中,制剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的1-20mg/ml的琥珀酸盐缓冲剂(例如约1至约20、约1至约10、约5至约20或约5至约10mg/ml)。在一个实施方案中,制剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的约1-10mg/ml的琥珀酸盐缓冲剂。

[0141] 在一个实施方案中,制剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的1-20mg/ml的柠檬酸盐缓冲剂(例如约1至约20、约1至约10、约5至约20或约5至约10mg/ml)。在一个实施方案中,制剂中所用的缓冲剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的约1-10mg/ml的柠檬酸盐缓冲剂。

[0142] 在一个实施方案中,制剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的1-20mg/ml的磷酸盐缓冲剂(例如约1至约20、约1至约10、约5至约20或约5至约10mg/ml)。在一个实施方案中,制剂中所用的缓冲剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的约1-10mg/ml的磷酸盐缓冲剂。

[0143] 在一个实施方案中,制剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至

约6.5的1-20mg/ml的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲剂(例如约1至约20、约1至约10、约5至约20或约5至约10mg/ml)。在一个实施方案中,制剂中所用的缓冲剂包含pH为约5.0至约7.0、pH为约5至约6.5或pH为约5.5至约6.5及之间的范围的约1-10mg/ml的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲剂。

[0144] 除了缓冲剂外,制剂还包括糖。可用于制剂中的糖的实例包括但不限于甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖和海藻糖。在一个实施方案中,制剂中所用的糖是蔗糖。

[0145] 在一个实施方案中,制剂包含浓度为约50至约90mg/ml、约50至约85mg/ml、约50至约80mg/ml、约50至约75mg/ml、约50至约70mg/ml、约50至约65mg/ml、约50至约60mg/ml、约60至约90mg/ml、约60至约85mg/ml、约60至约75mg/ml、约60至约70mg/ml或约60至约75mg/ml及之间范围的糖,例如约55至约85mg/ml和之间范围的糖。

[0146] 在一个实施方案中,制剂包含浓度为约50至约90mg/ml、约50至约85mg/ml、约50至约80mg/ml、约50至约75mg/ml、约50至约70mg/ml、约50至约65mg/ml、约50至约60mg/ml、约60至约90mg/ml、约60至约85mg/ml、约60至约75mg/ml、约60至约70mg/ml、或约60至约75mg/ml及之间范围的蔗糖,例如约55至约85mg/ml和之间范围的蔗糖。

[0147] 还在制剂中添加表面活性剂,例如用于增加稳定性。示范性的表面活性剂包括但不限于非离子型洗涤剂例如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20、80)或泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188)。

[0148] 在一个实施方案中,制剂包含浓度为约0.05-0.20mg/ml(例如约0.05-0.19、0.05-0.18、0.05-0.17、0.05-0.16、0.05-0.15、0.05-0.14、0.05-0.13、0.05-0.12、0.05-0.11或0.05-0.10mg/ml及之间的范围)的聚山梨醇酯,例如聚山梨醇酯80。在一个实施方案中,制剂包含0.05-0.15mg/ml的聚山梨醇酯,例如聚山梨醇酯80。

[0149] 在一个实施方案中,制剂包含浓度为约1-150mg/ml的抗EGFR抗体药物偶联物(例如约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、125、130、135、140、145或150mg/ml及之间的范围的抗EGFR抗体药物偶联物)。

[0150] 在一个实施方案中,制剂包含约1-150mg、约10-150mg、约20-150mg、约30-150mg、约40-150mg、约50-150mg、约60-150mg、约70-150mg、约80-150mg、约90-150mg、约100-150mg、约10-140mg、约20-140mg、约30-140mg、约40-140mg、约50-140mg、约60-140mg、约70-140mg、约80-140mg、约90-140mg、约100-140mg、约10-130mg、约20-130mg、约30-130mg、约40-130mg、约50-130mg、约60-130mg、约70-130mg、约80-130mg、约90-130mg、约100-130mg、约10-120mg、约20-120mg、约30-120mg、约40-120mg、约50-120mg、约60-120mg、约70-120mg、约80-120mg、约90-120mg、约100-120mg、约10-110mg、约20-110mg、约30-110mg、约40-110mg、约50-110mg、约60-110mg、约70-110mg、约80-110mg、约90-110mg和约100-110mg及之间的范围的量的抗EGFR抗体药物偶联物。

[0151] 在一个实施方案中,制剂包含抗体浓度为1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml、56mg/ml、57mg/ml、58mg/ml、59mg/ml、60mg/ml、61mg/ml、62mg/ml、

63mg/ml、64mg/ml、65mg/ml、66mg/ml、67mg/ml、68mg/ml、69mg/ml、70mg/ml、71mg/ml、72mg/ml、73mg/ml、74mg/ml、75mg/ml、76mg/ml、77mg/ml、78mg/ml、79mg/ml、80mg/ml、81mg/ml、82mg/ml、83mg/ml、84mg/ml、85mg/ml、86mg/ml、87mg/ml、88mg/ml、89mg/ml、90mg/ml、91mg/ml、92mg/ml、93mg/ml、94mg/ml、95mg/ml、96mg/ml、97mg/ml、98mg/ml、99mg/ml、100mg/ml、101mg/ml、102mg/ml、103mg/ml、104mg/ml、105mg/ml、106mg/ml、107mg/ml、108mg/ml、109mg/ml、110mg/ml、111mg/ml、112mg/ml、113mg/ml、114mg/ml、115mg/ml、116mg/ml、117mg/ml、118mg/ml、119mg/ml、120mg/ml、121mg/ml、122mg/ml、123mg/ml、124mg/ml、125mg/ml、126mg/ml、127mg/ml、128mg/ml、129mg/ml、130mg/ml、131mg/ml、132mg/ml、133mg/ml、134mg/ml、135mg/ml、136mg/ml、137mg/ml、138mg/ml、139mg/ml、140mg/ml、141mg/ml、142mg/ml、143mg/ml、144mg/ml、145mg/ml、146mg/ml、147mg/ml、148mg/ml、149mg/ml或150mg/ml的抗EGFR抗体药物偶联物。包含任何上述数值的范围也包括于本发明中,例如10-150mg/ml、10-100mg/ml、20-90mg/ml、10-70mg/ml、10-40mg/ml和1-70mg/ml。

[0152] 在一个方面,本发明涉及从包含抗EGFR抗体药物偶联物的冻干制剂重构的水性制剂,其中所述重构的水性制剂包含约1-100mg/ml抗EGFR ADC、约1-10mg/ml缓冲剂(例如组氨酸)、约50-90mg/ml糖(例如蔗糖)和约0.01-0.2mg/ml聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80),且其pH为约5-7,和其中所述抗EGFR抗体药物偶联物包含与阿里他汀(例如MMAF)偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分(例如抗体1)。

[0153] 冻干制剂初始制备成预冻干制剂(其为在冻干过程之前的制剂)。考虑到需要的剂量体积、施用方式等确定预冻干制剂中存在的抗EGFR抗体药物偶联物的量。

[0154] 在一个方面,本发明涉及包含抗EGFR抗体药物偶联物、糖(例如蔗糖)、表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)和组氨酸的冻干制剂,其中所述制剂的pH为约5-7,且其中所述抗EGFR抗体药物偶联物包含与阿里他汀(例如MMAF)偶联的抗EGFR抗体(例如抗体1)。

[0155] 在本发明的一个实施方案中,冻干制剂包含抗EGFR ADC(例如ADC1-MMAF)、蔗糖、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)和组氨酸,且不包括或基本上不含甘露糖醇和/或丝氨酸。在本发明的一个实施方案中,冻干制剂包含抗EGFR ADC(例如ADC1-MMAF)、蔗糖、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)和组氨酸,且不包括或基本上不含二价阳离子。在本发明的另一个实施方案中,冻干制剂不包括乳糖酸。在本发明的另一个实施方案中,冻干制剂不包括糖酸。

[0156] 在某些示例性方面,本发明涉及pH范围为约5-7且包含1-20mg缓冲剂(例如组氨酸)、约320-410mg糖(例如蔗糖)、约0.1-0.9mg表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)和约50-150mg抗EGFR抗体药物偶联物的冻干制剂,其中所述抗EGFR抗体药物偶联物包含与阿里他汀(例如MMAF)偶联的抗EGFR抗体(例如抗体1)。

[0157] 在一个实施方案中,冻干制剂包含约320-410mg、约330-400mg、约340-390mg、约350-380mg或约360-700mg及之间的范围(例如335mg-375mg)的糖(例如蔗糖)。

[0158] 在一个实施方案中,冻干制剂包含约0.1-0.9mg表面活性剂(例如约0.1-0.8、0.1-0.7、0.01-0.6、0.01-0.55、0.2-0.6、0.3-0.6、0.4-0.6和之间的范围)。

[0159] 在一个实施方案,冻干制剂包含约1-150mg、约10-150mg、约20-150mg、约30-150mg、约40-150mg、约50-150mg、约60-150mg、约70-150mg、约80-150mg、约90-150mg、约100-150mg、约10-140mg、约20-140mg、约30-140mg、约40-140mg、约50-140mg、约60-140mg、

约70-140mg、约80-140mg、约90-140mg、约100-140mg、约10-130mg、约20-130mg、约30-130mg、约40-130mg、约50-130mg、约60-130mg、约70-130mg、约80-130mg、约90-130mg、约100-130mg、约10-120mg、约20-120mg、约30-120mg、约40-120mg、约50-120mg、约60-120mg、约70-120mg、约80-120mg、约90-120mg、约100-120mg、约10-110mg、约20-110mg、约30-110mg、约40-110mg、约50-110mg、约60-110mg、约70-110mg、约80-110mg、约90-110mg和约100-110mg及之间的范围的量的抗EGFR抗体药物偶联物。

[0160] 在一个实施方案中,冻干制剂包含1-20mg/ml组氨酸,或者2-18mg、3-17mg、4-16mg、5-15mg、6-14mg或7-13mg及之间的范围。

[0161] 可以根据本领域已知的方法进行冻干。例如,用于此目的的很多不同冷冻干燥机是可获得的,例如HULL50 (Hull, USA) 或GT20 (Leybold-Heraeus, Germany) 冷冻干燥机。通过冷冻制剂并随后在适于初级干燥 (primary drying) 的温度下将冰从冷冻物升华来完成冷冻干燥。在这种条件下,产物温度低于制剂的共晶点或坍塌温度。通常,在合适的压力 (范围通常为约50-250毫托) 下,用于初级干燥的搁板温度范围为约-30至25℃ (只要产物在初级干燥期间保持冷冻)。制剂、容纳样品的容器的大小和类型 (例如玻璃小瓶) 和液体的体积将主要决定干燥需要的时间,其范围可能从几小时至几天不等 (例如40-60小时)。任选地,取决于产物中所需的残余水分含量,也可以进行次级干燥阶段。进行次级干燥的温度范围为约0-40℃,主要取决于容器的类型和大小以及所用蛋白的类型。例如,在冻干的整个水分去除阶段中搁板温度可以为约15-30℃ (例如约20℃)。次级干燥所需的时间和压力将是产生合适的冻干饼 (lyophilized cake) 的时间和压力,其取决于例如温度和其他参数。次级干燥时间由产物中所需的残余水分含量决定,且通常需要至少约5小时 (例如10-15小时)。压力可以与在初级干燥步骤期间采用的相同。冷冻干燥条件可以随制剂和小瓶的大小而改变。

[0162] 在向患者施用前,冻干制剂用药学上可接受的稀释剂重构,使得在重构制剂中抗EGFR抗体药物偶联物的浓度为例如治疗所需的 (例如至少约1-150mg/ml)。重构通常在约25℃的温度下进行以确保完全水化,尽管按照需要可以使用其他温度。重构所需的时间将取决于例如稀释剂的类型、赋形剂的量和蛋白质。示范性稀释剂包括无菌水、抑菌注射用水 (BWFI)、pH缓冲溶液 (例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液 (例如0.9%盐水溶液)、林格氏溶液或葡萄糖溶液。在一个实施方案中,将冻干剂溶于用于无菌注射用水中,并用无菌生理盐溶液稀释。稀释剂任选地包含防腐剂。示范性防腐剂如上所述,优选的防腐剂是芳香醇,例如苄醇或酚醇。采用的防腐剂的量通过评估与蛋白质相容的不同防腐剂浓度和防腐剂效力试验来确定。比如,如果防腐剂是芳香醇 (例如苄醇),它可以以约0.1-2.0%、约0.5-1.5%或约1.0-1.2%的量存在。

### [0163] III. 用于本发明制剂的抗EGFR抗体药物偶联物

[0164] 在此所述的制剂和方法涵盖包含特异性结合EGFR的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗体药物偶联物 (ADC) 的用途。在本发明制剂中所用的抗EGFR抗体药物偶联物与治疗剂偶联,从而所述治疗剂对表达EGFR的细胞发挥细胞毒性、细胞抑制或免疫抑制的作用。

[0165] 具体地,本发明涉及包含含有识别在致瘤性、过度增殖或异常细胞中发现的EGFR表位的抗体或抗原结合部分的抗EGFR抗体药物偶联物的制剂,其中所述表位在正常或野生型细胞中检测不到。优选地,抗体或其抗原结合部分在缺乏过表达且存在正常EGFR翻译后

修饰的情况下不结合或识别包含正常或野生型EGFR表位的正常或野生型细胞。

[0166] 适用于本发明制剂和方法的抗EGFR抗体通常是单克隆的,且可以包括例如嵌合(例如,具有人恒定区和小鼠可变区)、人源化或人抗体;单链抗体等。免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类。例如,用于本发明的抗EGFR抗体药物偶联物中的抗EGFR抗体可以是抗EGFR抗体1或2或其抗原结合部分。抗EGFR抗体1和2的序列和特性如下所述(也参见其全文通过引用在此并入本文的WO 2011/041319和US20110076232(参见例如图55的抗体序列))。抗体1和2各自靶向在50%的所有表皮起源癌症中存在的表皮生长因子受体(EGFR)的过表达形式。

[0167] 在本发明的具体的实施方案中,用于抗EGFR抗体药物偶联物中的抗EGFR抗体识别扩增的野生型EGFR和de2-7 EGFR。抗EGFR抗体(或抗EGFR ADC)显示有用的特异性,因为它识别de2-7 EGFR和扩增的EGFR,但不识别正常的、野生型EGFR或de2-7 EGFR特征性的独特接合肽。具有这些结合特征的抗体的实例是抗体1、抗体2和抗体3。以下提供抗体1和抗体2的序列。

[0168] 抗体2是单克隆鼠抗EGFR抗体。抗体2的VH链包含如下所示的核酸序列(SEQ ID NO:1)和具有信号肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)(SEQ ID NO:2中下划线的是信号肽)。

[0169] SEQ ID NO:1

[0170] ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTACAGCCTTTCCTGGTGTCTGTCTGATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATTCTTCTCTGCAGTTGAATTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTATTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0171] SEQ ID NO:2

[0172] MRVLILLWLFTAFPGVLSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTLVTVSA

[0173] 抗体2的VL链包含如下所示的核酸序列(SEQ ID NO:3)和氨基酸序列(SEQ ID NO:4)(SEQ ID NO:4中下划线的是信号肽)。

[0174] SEQ ID NO:3

[0175] ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCATTCTTGTGCTTTGGTTTCCAGGTGCAAGATGTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAGACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTTGGACGATGAAGTTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGT

[0176] SEQ ID NO:4

[0177] MVSTAQFLAFLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKR

[0178] 以下下划线示出了不具有信号肽的VH链序列SEQ ID NO:2的互补决定区CDR1、

CDR2和CDR3 (分别是SEQ ID NO:5、6和7) (SEQ ID NO:11)。VH链序列(SEQ ID NO:11)的关键残基是24、37、48、67和78。

[0179] SEQ ID NO:11

[0180] DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKL

[0181] CDR1

[0182] EWMGYISYSGNTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTAT

[0183] CDR2

[0184] YYCVTAGRGFPYWGQGLVTVSA

[0185] CDR3

[0186] 以下下划线示出了不具有信号肽的VL链序列SEQ ID NO:4的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3 (分别是SEQ ID NO:8、9和10) (SEQ ID NO:12)。VH链序列(SEQ ID NO:12)的关键残基是36、46、57和71。

[0187] SEQ ID NO:12

[0188] DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKG

[0189] CDR1

[0190] LIYHGTNLDDDEVSPRFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYA

[0191] CDR2 CDR3

[0192] QFPWTFGGGTKLEIKR

[0193] 抗体3是嵌合抗体,其包含抗体2的轻链和重链的可变域及人恒定区。

[0194] 在本发明的一个实施方案中,用于本发明制剂和方法中的抗EGFR抗体是抗体1。如上所述,抗体1是包含抗体2的CDR的人源化抗EGFR抗体。以下SEQ ID NO:13和14分别示出了抗体1的重链可变区(VH)和恒定区(CH)。VH区的CDR1、CDR2和CDR3 (分别是SEQ ID NO:15、16和17)如下划线所示。

[0195] SEQ ID NO:13

[0196] QVQLQESGPGSLVKPSQTLSTCTVSGYISSDFAWNWIRQPPGKGL

[0197] CDR1

[0198] EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA

[0199] CDR2

[0200] TYYCVTAGRGFPYWGQGLVTVSS

[0201] CDR3

[0202] SEQ ID NO:14

[0203] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0204] 以下SEQ ID NO:18和19分别示出了抗体1的轻链可变区(VL)和恒定区(CL)。VL区的CDR1、CDR2和CDR3 (分别是SEQ ID NO:20、21和22)如下划线所示。

[0205] SEQ ID NO:18

[0206] DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKG

[0207] CDR1

[0208] LIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA

[0209] CDR2

CDR3

[0210] QFPWTFGGGTKLEIKR

[0211] SEQ ID NO:19

[0212] TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0213] 在一个实施方案中,本发明涉及包含抗EGFR抗体药物偶联物、蔗糖、聚山梨醇酯80和组氨酸的冻干制剂,其中所述制剂的pH为5-7,其中所述抗EGFR抗体药物偶联物包含与单甲基阿里他汀F (MMAF) 偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分,且其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR),且该轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR。

[0214] 在一个实施方案中,本发明提供pH为约5-7且包含含有抗体或其抗原结合部分的抗EGFR ADC、组氨酸、糖(例如蔗糖)和聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)的冻干制剂,所述抗体或其抗原结合部分包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链恒定区,和具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0215] 在一个实施方案中,本发明提供包含含有抗EGFR抗体(与阿里他汀例如MMAF偶联)的ADC的制剂,所述抗EGFR抗体具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列中描述的CDR的轻链可变区,和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列中描述的CDR的重链可变区。

[0216] 可以通过本领域已知的任何合适方法产生用于制备抗EGFR抗体药物偶联物的抗EGFR抗体。例如,可以使用各种技术,例如使用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术或其组合制备单克隆抗体。例如,Harlow等,Antibodies:A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed.,1988)和Hammerling等,In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas,pp.563-681 (Elsevier,N.Y.,1981)中总体地讨论了杂交瘤技术。可以用来制备抗CD70抗体的噬菌体展示方法的实例包括例如在Brinkman等,1995,J Immunol Methods 182:41-50;Ames等,1995,J Immunol Methods 184:177-186;Kettleborough等,1994,Eur J Immunol 24:952-958;Persic等,1997,Gene 187:9-18;Burton等,1994,Advances in Immunology 57:191-280;PCT申请号PCT/GB91/01134;PCT公开WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;及美国专利号5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743和5,969,108(其公开通过引用在此并入本文)中描述的那些。

[0217] 用于产生识别特定表位的抗体片段的技术通常也是本领域已知的。例如,可以通过使用酶例如木瓜蛋白酶(产生Fab片段)或胃蛋白酶(产生F(ab')<sub>2</sub>片段)蛋白水解切割免疫球蛋白分子来产生Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。F(ab')<sub>2</sub>片段包含可变区、轻链恒定区和重链CH1结构域。还可以使用例如PCT公开WO 92/22324;Mullinax等,1992,BioTechniques 12(6):864-869;和Sawai等,1995,AJRI 34:26-34;和Better等,1988,Science 240:1041-1043(其

公开通过引用在此并入本文) 中公开的方法来利用重组产生Fab、Fab' 和F(ab')<sub>2</sub>片段的技术。

[0218] 可以用来产生单链Fv和抗体的技术的实例包括在美国专利号4,946,778和5,258,498;Huston等,1991,Methods in Enzymology 203:46-88;Shu等,1993,Proc Natl Acad Sci USA 90:7995-7999;和Skerra等,1988,Science 240:1038-1040中描述的那些。

[0219] 可以通过本领域已知的多种技术的任一种产生抗体。例如,从宿主细胞表达,其中通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染入宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意欲涵盖通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞的各种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡萄糖转染等。

[0220] 用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括在Urlaub和Chasin(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中描述的dhfr-CHO细胞,其与例如描述于Kaufman和Sharp(1982)J.Mol.Biol.159:601-621中的DHFR选择标记一起使用)和DG44或DUXB11细胞(Urlaub等(1986)Som.Cell Molec.Genet.12:555;Haynes等(1983)Nuc.Acid.Res.11:687-706;Lau等(1984)Mol.Cell.Biol.4:1469-1475)、NS0骨髓瘤细胞、猴肾细胞系(例如CVI和COS,例如COS7细胞)、SP2细胞、人胚肾(HEK)细胞,例如HEK-293细胞、中国仓鼠成纤维细胞(例如R1610)、人宫颈癌细胞(例如HELA)、鼠成纤维细胞(例如BALBc/3T3)、鼠骨髓瘤细胞(P3x63-Ag3.653;NS0;SP2/O)、仓鼠肾细胞系(例如HAK)、鼠L细胞(例如L-929)、人淋巴细胞(例如RAJI)、人肾细胞(例如293和293T)。宿主细胞系通常可商购获得(例如从BD Biosciences, Lexington, Ky.;Promega, Madison, Wis.;Life Technologies, Gaithersburg, Md.)或从American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, Va.)获得。

[0221] 当将编码抗体的表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养足够允许在宿主细胞中表达抗体或允许抗体分泌至宿主细胞在其中生长的培养基中的时间产生抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。

[0222] 在用于抗体重组表达的示范性系统中,通过磷酸钙介导的转染将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入dhfr-CHO细胞中。在重组表达载体中,抗体重链和轻链cDNA各自可操作地与CMV增强子/AdMLP启动子调控元件连接以驱动cDNA的高水平转录。重组表达载体还携带编码DHFR的cDNA,其允许使用氨甲喋呤选择/扩增来选择已经转染有载体的CHO细胞。培养选择的转化体宿主细胞以允许抗体重链和轻链的表达,并从培养基中回收完整的抗体。使用标准分子生物学技术来制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基回收抗体。还进一步地,本发明提供通过在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞直到抗体合成来合成抗体的方法。该方法可进一步包括从培养基分离抗体。

[0223] 本发明所用的抗EGFR抗体药物偶联物包含与细胞毒性剂或免疫抑制剂偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分,使得所得的ADC对表达EGFR的癌细胞发挥细胞毒性或细胞抑制作用。因此,抗EGFR抗体药物偶联物对表达EGFR的癌细胞发挥细胞毒性或细胞抑制作用。在一个实施方案中,抗EGFR ADC内化并在表达EGFR的细胞中累积,ADC在此发挥治疗效果(例如细胞毒性、细胞抑制或免疫抑制效果)。

[0224] 用于与抗体偶联的合适部分的实例包括化疗剂、前药转化酶、放射性同位素或化

合物、或者毒素。在示范性实施方案中,抗EGFR抗体或其抗原结合部分与阿里他汀(例如 MMAF或MMAE)偶联。任何对癌细胞或激活的免疫细胞发挥治疗效果的试剂均可用于与抗EGFR抗体或其衍生物偶联的治疗剂(参见例如WO 2004/010957,“Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease”(同上)和美国临时申请号60/400,403(同上))。通常,治疗剂是细胞毒性剂。在一些实施方案中,抗EGFR药物偶联物包含每个偶联物多于一个治疗剂,例如每个偶联物约1至约20个治疗剂。

[0225] 在优选的实施方案中,抗EGFR抗体或其抗原结合部分与阿里他汀(一个或多个)偶联。已经表明阿里他汀干扰微管动力学、GTP水解和/或细胞核和细胞分裂,且具有抗癌和/或抗真菌活性。

[0226] 本发明的抗EGFR抗体可与至少一个阿里他汀偶联。阿里他汀代表一组多拉司他汀类似物,其通常表明通过干扰微管动力学和GTP水解来抑制细胞分裂,从而具有抗癌活性。例如,阿里他汀E(描述于在此通过引用并入本文的美国专利号5,635,483)是海洋天然产物多拉司他汀10(一种通过与微管蛋白上抗癌药物长春新碱相同的位点结合来抑制微管蛋白聚合的化合物)的合成类似物(G.R.Pettit, Prog. Chem. Org. Nat. Prod, 70:1-79 (1997))。多拉司他汀10、阿里他汀PE和阿里他汀E是具有四个氨基酸的线性肽,其中三个对于多拉司他汀类化合物是独特的。有丝分裂抑制剂的阿里他汀子类的示范性实施方案包括但不限于,单甲基阿里他汀D(MMAD或阿里他汀D衍生物)、单甲基阿里他汀E(MMAE或阿里他汀E衍生物)、单甲基阿里他汀F(MMAF或阿里他汀F衍生物)、阿里他汀F苯二胺(AFP)、阿里他汀EB(AEB)、阿里他汀EFP(AEFP)和5-苯甲酰戊酸-AE酯(AEVB)。阿里他汀衍生物的合成和结构描述于各自在此通过引用并入本文的美国专利申请公开号2003-0083263、2005-0238649和2005-0009751、国际专利公开号WO 04/010957、国际专利公开号WO 02/088172及美国专利号6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414。

[0227] 在一个实施方案中,抗EGFR抗体(例如抗体1)通过接头(例如但不限于马来酰亚胺基己酰基)(mc-MMAF)与至少一个MMAF(单甲基阿里他汀F)偶联。图2示出了MMAF的结构。抗EGFR抗体ADC的药物-抗体比率(DAR)可以为2、4、6或8。值得注意的是,ADC的DAR范围可以为0-8,尽管更高载量,例如10也是可能的。单甲基阿里他汀F(MMAF)通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂。与其不带电的对应物MMAE相比,它具有带电的C末端苯丙氨酸残基,这减弱其细胞毒性活性。因为它的毒性,其本身不能用作药物,但可以与将其指引到癌细胞的单克隆抗体(mAb)连接。在一个实施方案中,抗EGFR抗体的接头在细胞外液中是稳定的,但一旦偶联物进入肿瘤细胞中,其被组织蛋白酶切割,从而激活抗有丝分裂机制。

[0228] 在一个实施方案中,本发明的抗EGFR抗体与至少一个MMAE(单甲基阿里他汀E)偶联。图1示出了MMAE的结构,其为包含MMAE的示范性ADC。单甲基阿里他汀E(MMAE, vedotin)通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂。由于它的超强毒性,其本身不能用作药物。在最近的癌症治疗发展中,它与识别癌细胞中表达的特定标志物的单克隆抗体(mAb)连接,并将MMAE指引到癌细胞。在一个实施方案中,将MMAE连接至抗EGFR抗体的接头在细胞外液(即,细胞外部的介质或环境)中是稳定的,但一旦偶联物与特异性癌细胞抗原结合并进入癌细

胞,则其被组织蛋白酶切割,从而释放毒性MMAE并激活有效的抗有丝分裂机制。

[0229] 在一个实施方案中,抗EGFR抗体或其抗原结合部分与阿里他汀(其为MMAF)偶联。在一个实施方案中,抗EGFR ADC是ADC 1-MMAF。ADC 1-MMAF包含与一个或多个单甲基阿里他汀F(MMAF)分子共价连接的抗体1(如上所述,且在SEQ ID NO:13-22中)(结构参见图2)。为了制备ADC 1-MMAF,抗体1的链间二硫键被还原成巯基。然后通过这些巯基将MMAF与抗体偶联。使用不可切割的接头(即,如图2所示的不可切割的马来酰亚胺基己酰基(mc)接头)制备ADC 1-MMAF。

[0230] 在一个具体的实施方案中,本发明的制剂包含用可检测的或功能性的标记物标记的抗EGFR ADC。可检测的标记物包括但不限于放射性标记,例如同位素<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>S、<sup>34</sup>S、<sup>35</sup>S、<sup>36</sup>S、<sup>36</sup>Cl、<sup>51</sup>Cr、<sup>57</sup>Co、<sup>58</sup>Co、<sup>59</sup>Fe、<sup>90</sup>Y、<sup>121</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>211</sup>At、<sup>198</sup>Au、<sup>67</sup>Cu、<sup>225</sup>Ac、<sup>213</sup>Bi、<sup>99</sup>Tc和<sup>186</sup>Re,其可以使用抗体成像领域中已知的常规化学作用连接至本发明的抗体。标记物还包括荧光标记和常规用于MRI-CT成像领域的标记。它们还包括酶标记,例如辣根过氧化物酶。标记物进一步包括可以通过结合特定的同源可检测部分(例如标记的抗生物素蛋白)来检测的化学部分,例如生物素。

[0231] 功能性标记物还可包括设计为靶向于肿瘤位点以造成肿瘤组织破坏的物质。此类功能性标记物包括细胞毒性药物(例如5-氟尿嘧啶或蓖麻毒素)和酶(例如细菌羧肽酶或硝基还原酶),其能够在肿瘤位点处将前药转化为活性药物。

[0232] 本领域技术人员将理解,上述试剂以及其他合适的药剂可以任何合适方式与抗EGFR抗体例如抗体1偶联或连接以制备可用于本发明的抗EGFR ADC。例如且非限制的,在本发明的各种实施方案中,抗EGFR抗体和药剂可以使用在本发明的各种实施方案中可切割或不可切割的接头、间隔物和/或延伸剂化合物共价连接和/或偶联,并导致治疗剂被靶细胞内化。

[0233] 在一个实施方案中,抗体1使用不可切割的马来酰亚胺基己酰基接头与MMAF偶联(抗体1-mc-MMAF)。

[0234] 将治疗剂与蛋白质,尤其是与抗体偶联的技术是公知的(参见例如Arnon等,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,"in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy(Reisfeld等eds.,Alan R.Liss,Inc.,1985);Hellstrom等,"Antibodies For Drug Delivery,"in Controlled Drug Delivery(Robinson等eds.,Marcel Dekker,Inc.,2nd ed.1987);Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review,"in Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications(Pinchera et al.eds.,1985);"Analysis, Results,and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,"in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy(Baldwin等eds.,Academic Press,1985);和Thorpe等,1982,Immunol.Rev.62: 119-58。还参见例如PCT公开WO 89/12624)。

[0235] 在一个实施方案中,ADC包含在细胞毒性剂和抗体之间的接头区。例如,此类接头、间隔物和/或延伸剂化合物包括但不限于以下:氨基苯甲酸间隔物(参见例如且非限制的其全文各自通过引用在此并入本文的美国专利号7,091,186和7,553,816)、马来酰亚胺基己酰基、p-氨基苄基氨甲酰基(PAB)、溶酶体酶可切割的接头(参见例如且非限制的其全文通

过引用在此并入本文的美国专利号6,214,345)、马来酰亚胺基己酰基-聚乙二醇20 (MC (PEG) 6-OH)、N-甲基-缬氨酸瓜氨酸、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸N-琥珀酰亚胺酯 (SMCC) (参见例如但不限于其全文通过引用在此并入本文的Yoshitake等(1979) Eur.J.Biochem.,101,395-399)、4-(2-吡啶二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺酯 (SPDB) (参见例如但不限于其全文通过引用在此并入本文的美国专利号4,563,304)、4-(2-吡啶二硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺酯 (SPP)、缬氨酸-瓜氨酸及其他接头、间隔物和/或延伸剂化合物(参见例如但不限于其全文各自通过引用在此并入本文的美国专利号7,090,843、7,223,837和7,659,241及美国专利公开号2004/0018194、2004/0121940、2006/0116422、2007/0258987、2008/0213289、2008/0241128、2008/0311136、2008/0317747和2009/0010945)。一般来说,用于将上述药剂以及其他药剂连接和/或偶联至本发明的特定结合成员,尤其是抗体及其片段的技术是本领域已知的。参见例如但不限于其全文各自通过引用在此并入本文的Amon等, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld等 (eds.), pp.243-56 (Alan R.Liss, Inc.1985); Hellstrom等, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson等 (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc.1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", In Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications, Pinchera等 (eds.), pp.475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin等 (eds.), pp.303-16 (Academic Press 1985) 和 Thorpe等, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol.Rev., 62:119-58 (1982)。

[0236] 将药物共价连接至抗体的多种不同反应是可得。这通常通过抗体分子的氨基酸残基(包括赖氨酸的胺基、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧基、半胱氨酸的巯基和芳族氨基酸的各种部分)的反应来完成。最常用的共价连接的非特异性方法之一是将化合物的羧基(或氨基)连接至抗体的氨基(或羧基)的碳二亚胺反应。此外,已经使用双官能试剂例如二醛或亚氨酸酯来连接化合物的氨基和抗体分子的氨基。还可用于连接药物与抗体的是希夫碱反应。该方法涉及包含二醇或羟基的药物的碘氧化,从而形成随后与抗体分子反应的醛。连接通过与抗体分子的氨基形成希夫碱而发生。也可以用异硫氰酸酯作为偶联剂将药物共价连接至抗体。其他技术是本领域技术人员已知的,且也在本发明的范围内。这些技术的非限制性实例描述于,例如其全文通过引用在此并入本文的美国专利号5,665,358、5,643,573和5,556,623。

[0237] 在一些实施方案中,中间体(其为接头的前体)与药物在合适条件下反应。在一些实施方案中,使用药物和/或中间体上的反应性基团。随后将药物和中间体之间反应的产物或衍生药物与抗EGFR抗体在合适条件下反应。

[0238] 偶联方法的其他实例描述于美国专利号7,837,980 (Seattle Genetics), Carter 和 Senter (2008) Cancer J, 14 (3):154, 以及美国公开申请号2004-0157782A1 和2005-0238649 和国际专利申请号PCT/US04/038392中。

[0239] 在一些实施方案中,可以纯化抗EGFR ADC以获得具有期望的药物抗体比率 (DAR)

的ADC。在本发明的一个实施方案中,制剂包含含有具有期望的平均药物抗体比率(DAR),例如平均DAR为约3的抗EGFR ADC的抗EGFR ADC混合物。在本发明的一个实施方案中,制剂包含含有具有期望DAR范围,例如DAR为约2-4的抗EGFR ADC的ADC混合物。

[0240] 在一个实施方案中,制剂包含ADC混合物,其中70%存在的ADC具有4或更低的载药种类,且其中ADC包含抗EGFR抗体和阿里他汀。或者,75%存在的ADC具有4或更低的载药种类;80%存在的ADC具有4或更低的载药种类;85%存在的ADC具有4或更低的载药种类;90%存在的ADC具有4或更低的载药种类;或95%存在的ADC具有4或更低的载药种类。

[0241] 在本发明的一个实施方案中,制剂包含含有与单甲基阿里他汀F(MMAF)偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗EGFR ADC、蔗糖、组氨酸和聚山梨醇酯80,其中所述ADC 1-MMAF包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR),且轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR,其中所述制剂包含平均DAR为约3的ADC混合物或DAR为约2-4的ADC混合物。在本发明的进一步的实施方案中,制剂是冻干的。还在进一步的实施方案中,抗EGFR抗体通过马来酰亚胺基己酰基接头与MMAF连接。还在进一步的实施方案中,抗EGFR抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0242] 在一个实施方案中,制剂包含含有与单甲基阿里他汀E(MMAE)偶联的抗EGFR抗体或其抗原结合部分的抗EGFR ADC、蔗糖、组氨酸和聚山梨醇酯80,其中所述ADC 1-MMAE包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含含有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR),且轻链可变区包含含有SEQ ID NO:20、21和22所示的氨基酸序列的CDR,其中所述制剂包含平均DAR为约3的ADC混合物或DAR为约2-4的ADC混合物。在本发明的进一步的实施方案中,制剂是冻干的。还在进一步的实施方案中,抗EGFR抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0243] 可以通过收集具有特定DAR的ADC的方式来实现ADC的纯化。例如,可以使用HIC树脂来将高载药量的ADC与具有最佳药物-抗体比率(DAR),例如DAR为4或更低的ADC分离。在一个实施方案中,在ADC混合物中添加疏水性树脂使得不需要的ADC,例如更高载药量的ADC与树脂结合,并可以选择性地从混合物中除去。在一些实施方案中,可以通过将ADC混合物(即,包含载药种类为4或更低的ADC和载药种类为6或更高的ADC的混合物)与疏水性树脂接触来实现ADC的分离,其中所述树脂的量足以允许待从ADC混合物中除去的载药种类的结合。树脂和ADC混合物混合在一起,使得待除去的ADC种类(即6或更高的载药种类)与树脂结合,且可以与ADC混合物中的其他ADC种类分离。在本方法中所用的树脂的量取决于待除去的种类和树脂之间的重量比,其中所用树脂的量不允许期望的载药种类的显著结合。因此,可以使用方法将5.5的平均DAR降低至小于4。此外,可以使用纯化方法来分离具有任何期望的载药种类范围,例如载药种类为4或更低、载药种类为3或更低、载药种类为2或更低、载药种类为1或更低的ADC。

[0244] 某些种类的分子基于所述种类与疏水性树脂之间的疏水相互作用与表面结合。在一个实施方案中,本发明的方法是指依赖于混合疏水性树脂与ADC混合物的互混的纯化方法,其中添加至混合物的树脂的量决定哪些种类(例如,DAR为6或更高的ADC)结合。在表达

系统(例如哺乳动物表达系统)中产生并纯化抗体之后,将抗体还原并通过偶联反应与药物偶联。所得ADC混合物通常包含DAR范围例如1-8的ADC。在一个实施方案中,ADC混合物包含载药种类为4或更低的药物和载药种类为6或更高的药物。根据本发明的方法,可以使用方法,例如但不限于分批处理纯化ADC混合物,从而选择载药种类为4或更低的ADC并将其与载药量更高的ADC(例如载药种类为6或更高的ADC)分离。值得注意的是,在此所述的纯化方法可用来分离具有任何期望的DAR范围(例如DAR为4或更低、DAR为3或更低、DAR为2或更低)的ADC。

[0245] 因此,在一个实施方案中,可以将包含载药种类为4或更低的药物和载药种类为6或更高的药物的ADC混合物与疏水性树脂接触以形成树脂混合物,其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类的显著结合;和从ADC混合物中除去疏水性树脂,从而获得包含ADC的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,且其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体。在单独的实施方案中,方法可以包括将包含4或更低的载药种类和6或更高的载药种类的ADC混合物与疏水性树脂接触以形成树脂混合物,其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类显著结合;和从ADC混合物中除去疏水性树脂,从而获得包含ADC的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,和其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体,其中疏水性树脂的重量是ADC混合物中6或更高的载药种类重量的3-12倍。

[0246] ADC分离方法可以使用批纯化方法进行。批纯化处理通常包括在容器中将ADC混合物添加至疏水性树脂、混合并然后将树脂与上清液分离。例如,在批纯化的情况下,可以将疏水性树脂在期望的平衡缓冲液中配制成或平衡至期望的平衡缓冲液。因此获得疏水性树脂浆液。然后将ADC混合物与浆液接触以用疏水性树脂吸附待分离的特定种类的ADC。然后将包含不与疏水性树脂材料结合的期望ADC的溶液与浆液分离,例如通过过滤或通过使浆液沉降并除去上清液。使所得浆液经受一个或多个洗涤步骤。为了洗脱结合的ADC,可以降低盐浓度。在一个实施方案中,本发明所用的方法包括不超过50g的疏水性树脂。

[0247] 因此,可以使用分批方法来使包含4或更低的载药种类和6或更高的载药种类的ADC混合物与疏水性树脂接触以形成树脂混合物,其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类的显著结合;和从ADC混合物中除去疏水性树脂,从而获得包含ADC的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,且其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体。在单独的实施方案中,使用分批方法将包含4或更低的载药种类和6或更高的载药种类的ADC混合物与疏水性树脂接触以形成树脂混合物,其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类显著结合;和从ADC混合物中除去疏水性树脂,从而获得包含ADC的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,且其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体,其中疏水性树脂的重量是ADC混合物中6或更高的载药种类重量的3-12倍。

[0248] 或者,可以使用循环方法进行纯化,从而树脂装填在容器中并使ADC混合物通过疏水性树脂床直到除去待分离的特定种类的ADC。然后从容器中泵出上清液(包含期望的ADC种类),并可以使树脂床经受洗涤步骤。

[0249] 也可以用循环方法使包含4或更低的载药种类和6或更高的载药种类的ADC混合物与疏水性树脂接触以形成树脂混合物,其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类的显著结合;和从ADC混合物中除去疏水性树脂,从而获得包含ADC的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,且其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体。在单独的实施方案中,用循环方法使包含4或更低的载药种类和6或更高的载药种类的ADC混合物与疏水性树脂接触以形成树脂混合物,其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类显著结合;和从ADC混合物中除去疏水性树脂,从而获得包含ADC的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,且其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体,其中疏水性树脂的重量是ADC混合物中6或更高的载药种类重量的3-12倍。

[0250] 或者,可以使用直流(flow through)方法进行纯化,从而树脂装填在容器(例如柱)中,并使ADC混合物通过填充的树脂,从而使期望的ADC种类基本上不与树脂结合并流过树脂,且不期望的ADC种类与树脂结合。直流方法可以单轮模式(其中作为单次通过容器的树脂的结果获得目标ADC种类)或多轮模式(其中作为多次通过容器的树脂的结果获得目标ADC种类)进行。实施直流方法从而使选择的树脂重量与不期望的ADC群体结合,而期望的ADC(例如DAR为2-4)流过树脂,并在一次或多次通过后在流通液中收集。

[0251] 在本发明的一个实施方案中,可以用直流方法使包含4或更低的载药种类和6或更高的载药种类的ADC混合物与疏水性树脂接触,其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类的显著结合;其中4或更低的载药种类通过树脂,并随后在一次或多次通过后收集从而获得包含期望的ADC(例如DAR为2-4)的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,且其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体。在单独的实施方案中,可以用直流方法使包含4或更低的载药种类和6或更高的载药种类的ADC混合物与疏水性树脂接触(通过使该ADC混合物通过树脂),其中与ADC混合物接触的疏水性树脂的量足够允许6或更高的载药种类与树脂结合,但不允许4或更低的载药种类的显著结合,其中4或更低的载药种类通过树脂并随后收集,从而获得包含ADC的组合物,其中所述组合物包含少于15%的6或更高的载药种类,且其中ADC包含与阿里他汀偶联的抗体,其中疏水性树脂的重量是ADC混合物中6或更高的载药种类重量的3-12倍。

[0252] 纯化方法可以基于使用疏水性树脂来分离高载药种类与低载药种类的ADC。疏水性树脂包含与ADC的疏水性质相互作用的疏水基团。ADC上的疏水基团与疏水性树脂内的疏水基团相互作用。蛋白质越疏水,其与疏水性树脂的相互作用越强。

[0253] 疏水性树脂一般包含与疏水性配体(例如烷基或芳基)偶联的基质(例如交联的琼脂糖或合成的共聚物材料)。很多疏水性树脂可商购获得。实例包括但不限于具有低或高取代的Phenyl Sepharose™ 6Fast Flow(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)、Phenyl Sepharose™ High Performance(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)、Octyl Sepharose™ High Performance(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)、Fractogel™ EMD丙基或Fractogel™ EMD苯基柱(E. Merck, Germany)、Macro-Prep™甲基或Macro-Prep™叔丁基支持物(Bio-Rad, California)、WP HI-丙基(C<sub>3</sub>)™(J. T. Baker, New

Jersey) 和 Toyopearl<sup>TM</sup> 醚、己基、苯基或丁基 (TosoHaas, PA)。在一个实施方案中, 疏水性树脂是丁基疏水性树脂。在另一个实施方案中, 疏水性树脂是苯基疏水性树脂。在另一个实施方案中, 疏水性树脂是己基疏水性树脂、辛基疏水性树脂或癸基疏水性树脂。在一个实施方案中, 疏水性树脂是具有 n-丁基配体的甲基丙烯酸聚合物 (例如 TOYOPEARL<sup>®</sup> Butyl-600M)。

[0254] 用于纯化分离低和高 DAR 的 ADC 的其他方法公开于其公开通过引用并入本文的美国临时申请号 61/792,834 和于 2014 年 3 月 14 日提交的美国申请号 14/210,602。

#### [0255] IV. 制剂用途

[0256] 根据本方法, 向患有需要用抗 EGFR 抗体或抗 EGFR-ADC 治疗的疾病 (或有患病风险) 的受试者施用包含抗 EGFR ADC 的制剂。在预防或治疗需要用抗 EGFR 抗体治疗的疾病中, 包含抗 EGFR ADC 的制剂可以单独施用或与其他组合物结合施用。

[0257] 如在此所用, 术语“其中 EGFR 活性有害的疾病”意欲包括其中患有疾病的受试者中 EGFR 的存在已经表明或怀疑造成该疾病的病理生理或是造成疾病恶化的因素的疾病和其他病症。因此, 其中 EGFR 活性有害的疾病是其中期望抑制 EGFR 活性来缓解疾病症状和/或进展的疾病。例如, 此类疾病可以由例如可以用例如抗 EGFR 抗体检测的来自患有该疾病的受试者的生物样品中存在的 EGFR 活性的提高或 EGFR 量的增加 (例如受试者的组织样品、血清、血浆、滑膜液等中 EGFR 浓度的增加) 来证明。

[0258] 本发明的制剂可用于治疗癌症。可以治疗的癌症的实例包括但不限于胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、鳞状细胞肿瘤、肛门癌、皮肤癌和外阴癌。

[0259] 在一个实施方案中, 可以向受试者施用包含 ADC1-MMAF 的制剂用于治疗结肠直肠癌、头颈癌 (包括但不限于下咽癌、口咽癌、食管癌、喉癌和口腔癌)、胰腺癌和胃癌。在本发明的一个方面, 向受试者使用包含 ADC1-MMAF 的制剂以治疗可能过表达表皮生长因子受体 (EGFR) 的实体肿瘤、鳞状非小细胞肺癌 (NSCLC) 或多形性胶质母细胞瘤。可以用本发明的组合物治疗的这类癌症的其他实例包括鳞状肿瘤 (包括肺、头颈部、宫颈等的鳞状肿瘤)、胶质母细胞瘤、胶质瘤、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、鳞状细胞肿瘤、肛门癌、皮肤癌和外阴癌。

[0260] 抗 EGFR ADC 的独特的特异性提供鉴定、表征、靶定和治疗、降低或消除多种致肿瘤细胞类型和肿瘤类型, 例如但不限于胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、头颈癌、乳腺癌、鳞状细胞肿瘤、肛门癌、皮肤癌和外阴癌的诊断和治疗用途, 而没有与用之前已知的 EGFR 抗体可观察到的一般组织摄取相关的问题。因此, 使用抗 EGFR ADC 可以识别、分离、表征、靶向和治疗或消除过表达 EGFR 的细胞 (例如通过扩增或表达突变体或变体 EGFR), 且在特定的实施方案中, 表现异常的翻译后修饰的那些。

[0261] 在本发明的一个方面, 提供治疗受试者的方法, 包括施用治疗有效量的在此所述的任何制剂中的抗 EGFR ADC, 其中所述受试者患有需要用制剂中的抗 EGFR 抗体治疗的疾病 (例如肿瘤、癌性状况、癌前状况和与过度增殖的细胞生长相关的或由其造成的任何状况), 例如但不限于可能过表达表皮生长因子受体 (EGFR) 的实体肿瘤或多形性胶质母细胞瘤。

[0262] 检测肿瘤中 EGFR 表达的方法是本领域已知的, 例如 EGFR pharmDx<sup>TM</sup> Kit (Dako)。相反, “EGFR 阴性肿瘤” 定义为如通过免疫组化技术测定的, 肿瘤样品中没有高于背景的 EGFR 膜染色的肿瘤。

[0263] 因此,通过染色或另外地识别其中存在EGFR过表达(尤其是扩增)和/或EGFR突变(尤其是de2-7 EGFR)的那些肿瘤或细胞,包含抗EGFR ADC的制剂可以用来分类EGFR肿瘤或致瘤细胞的性质。此外,已经表明抗EGFR ADC针对包含扩增的EGFR的肿瘤和针对de2-7 EGFR阳性异种移植物显示显著的体内抗肿瘤活性。

[0264] 因此,在本发明的进一步方面,提供治疗肿瘤、癌性状况、癌前状况和与过度增殖的细胞生长相关或由其造成的任何状况的方法,包括施用在此所述的制剂中的抗EGFR ADC。

[0265] 各种递送系统是已知的,且可用于施用包含抗EGFR ADC的制剂。导入的方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。ADC可以通过例如灌注或静脉推注、通过经上皮或粘膜衬层(mucocutaneous lining)(如口腔粘膜、直肠和小肠粘膜等)的吸收施用,并可以与其它生物活性剂(如化疗剂)一起施用。施用可以是全身的或局部的。在一个实施方案中,本发明的制剂静脉内递送至受试者。在另一个实施方案中,本发明的制剂皮下递送至受试者。在一个实施方案中,受试者给他/她自己施用制剂(自身施用)。

[0266] 可以通过标准临床技术确定在需要制剂中抗EGFR ADC治疗的疾病(例如癌症)的治疗或预防中有效的ADC的量。此外,任选地采用体外试验来帮助确定最佳剂量范围。精确剂量还将取决于施用途径及免疫疾病或表达EGFR的癌症的阶段,且可以根据医生的判断和各个患者的情况来决定。在一个实施方案中,向需要其的受试者施用治疗有效量的制剂中的抗EGFR ADC。如在此所用,术语抗EGFR ADC的“治疗有效量”或“有效量”是指在治疗其中ADC治疗是有效的疾病的症状的预防或治疗或缓解中有效的量。制剂中抗EGFR ADC的治疗有效量的实例是足够抑制有害的EGFR活性或治疗其中EGFR活性有害的疾病的量。

[0267] 抗EGFR ADC的剂量可以,例如每天、每周一次(每周)、每周两次、每周三次、每周四次、每周五次、两周一次、每三周、每个月或每四周或另外地根据需要施用。

[0268] 在一些实施方案中,在一些实施方案中,抗EGFR ADC可以与一种或多种其他治疗剂共施用给受试者以治疗癌症。术语“共施用”是指通过在同一药物组合物或单独的药物组合物中组合向受试者施用两种或更多种不同药剂或治疗(例如放射治疗)。因此,共施用包括向同一受试者同时施用包含两种或更多种药剂的单一药物组合物或在相同或不同时间施用两种或更多种不同组合物。

[0269] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,其中所述药剂的实例包括,例如辐射、烷化剂、血管生成抑制剂、抗体、抗代谢物、抗有丝分裂剂、抗增殖剂、抗病毒药、极光激酶抑制剂、细胞凋亡促进剂(例如Bcl-xL、Bcl-w和Bcl-1)的抑制剂、死亡受体途径激活剂、Bcr-Abl激酶抑制剂、BiTE(双特异性T细胞衔接剂)抗体、抗体药物偶联物、生物反应调节剂、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、细胞周期抑制剂、环氧合酶-2抑制剂、DVD(双可变域抗体)、白血病病毒癌基因同源物(ErbB2)受体抑制剂、生长因子抑制剂、热休克蛋白(HSP)-90抑制剂、组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂、激素疗法、免疫剂、凋亡蛋白抑制剂(IAP)的抑制剂、嵌入抗生素、激酶抑制剂、驱动蛋白抑制剂、Jak2抑制剂、雷帕霉素抑制剂的哺乳动物靶标、微RNA、有丝分裂原激活细胞外信号调节的激酶抑制剂、多价结合蛋白、非类固醇抗炎药(NSAID)、聚ADP(二磷酸腺苷)-核糖聚合酶(PARP)抑制剂、铂化疗剂、polo样激酶(Plk)抑制剂、磷脂酰肌醇-3激酶(溴区结构域)

抑制剂、蛋白酶体抑制剂、嘌呤类似物、嘧啶类似物、受体酪氨酸激酶抑制剂、etinoid/deltoid植物生物碱、抑制性小核糖核酸(siRNA)、拓扑异构酶抑制剂、泛素连接酶抑制剂等,以及这些试剂中一种或多种的组合。

[0270] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括BiTE抗体(其为通过同时结合两个细胞指引T细胞以攻击癌细胞的双特异性抗体)。然后T细胞攻击靶癌细胞。BiTE抗体的实例包括阿德木单抗(Micromet MT201)、blinatumomab(Micromet MT103)等。不受理论限制,T细胞引起靶癌细胞凋亡的机制之一是通过溶细胞颗粒成分(其包括穿孔素和颗粒酶B)的胞吐作用。在这方面,已经表明Bcl-2通过穿孔素和颗粒酶B两者减弱凋亡的诱导。这些数据表明,当靶向癌细胞时,Bcl-2的抑制可以增强T细胞诱发的细胞毒性作用(V.R.Sutton,D.L.Vaux和J.A.Trapani,J.of Immunology 1997,158(12),5783)。

[0271] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括siRNA。siRNA是具有内源RNA碱基或化学修饰的核苷酸的分子。修饰没有消除细胞活性,反而赋予增强的稳定性和/或增强的细胞效力。化学修饰的实例包括硫代磷酸酯基团、2'-脱氧核苷酸、含2'-OH<sub>3</sub>的核糖核苷酸、2'-F-核糖核苷酸、2'-甲氧乙基核糖核苷酸、它们的组合等等。siRNA的长度(例如10-200bp)和结构(例如发夹、单/双链、凸起、缺口/空位、错配)可以变化,并在细胞中被加工以提供活性基因的沉默。双链siRNA(dsRNA)在各条链上可以具有相同数量的核苷酸(平端)或可以具有非对称末端(突出端)。1-2个核苷酸的突出端可以在有义和/或反义链上存在,以及可以在给定链的5'-和/或3'-端上存在。

[0272] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括DVD和其他多价结合蛋白。多价结合蛋白是包含两个或更多个抗原结合位点的结合蛋白。多价结合蛋白被工程化以具有三个或更多个抗原结合位点,且通常不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”是指能够结合两个或更多个相关或不相关靶标的结合蛋白。双重可变域(DVD)结合蛋白是包含两个或更多个抗原结合位点的四价或多价结合蛋白结合蛋白。这类DVD可以是单特异性的(即能够结合一种抗原)或多特异性的(即能够结合两种或更多种抗原)。包含两条重链DVD多肽和两条轻链DVD多肽的DVD结合蛋白称为DVD Ig。DVD Ig的各一半包含重链DVD多肽、轻链DVD多肽和两个抗原结合位点。每个结合位点包含重链可变域和轻链可变域,每个抗原结合位点共有6个CDR参与抗原结合。多特异性DVD包括结合DLL4和VEGF、或者C-met和EGFR或者ErbB3和EGFR的DVD结合蛋白。

[0273] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括烷化剂。烷化剂包括六甲蜜胺、AMD-473、AP-5280、apaziquone、苯达莫司汀、brotallicin、白消安、卡波醌、卡莫司汀(BCNU)、苯丁酸氮芥、**CLORETAZINE**<sup>®</sup>(laromustine,VNP 40101M)、环磷酰胺、氮烯咪胺(decarbazine)、雌氮芥、福莫司汀、葡磷酰胺、异环磷酰胺、KW-270、洛莫司汀(CCNU)、马磷酰胺、美法兰、二溴甘露醇、二溴卫矛醇、尼莫司汀、氮芥N-氧化物、雷莫司汀、替莫唑胺、噻替哌、**TREANDA**<sup>®</sup>(苯达莫司汀)、苏消安、rofosfamide等。

[0274] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共

施用以治疗癌症,包括血管生成抑制剂。血管生成抑制剂包括内皮特异性受体酪氨酸激酶(Tie-2)抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、胰岛素生长因子-2受体(IGFR-2)抑制剂、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)抑制剂、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)抑制剂、血小板源生长因子受体(PDGFR)抑制剂、血小板反应蛋白类似物、血管内皮生长因子受体酪氨酸激酶(VEGFR)抑制剂等。

[0275] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括抗代谢物。抗代谢物包括ALIMTA<sup>®</sup>(培美曲塞二钠、LY231514、MTA)、5-阿扎胞苷、XELODA<sup>®</sup>(卡培他滨)、卡莫氟、LEUSTAT<sup>®</sup>(克拉屈滨)、氯法拉滨、阿糖胞苷、阿糖胞苷十八烷基磷酸酯、胞嘧啶阿拉伯糖苷、地西他滨、去铁胺、脱氧氟尿苷、依氟鸟氨酸、EICAR(5-乙炔基-1-β-D-呋喃核糖基咪唑-4-甲酰胺)、依诺他滨、乙炔基胞苷、氟达拉滨、单独或与亚叶酸组合的5-氟尿嘧啶、GEMZAR<sup>®</sup>(吉西他滨)、羟基脲、ALKERAN<sup>®</sup>(美法仑)、巯基嘌呤、6-巯基嘌呤核苷、氨甲喋呤、霉酚酸、奈拉滨、诺拉曲塞、ocfosfate、吡利曲索、喷司他丁、雷替曲塞、利巴韦林、triapine、曲美沙特、S-1、噻唑呋林(tiazofurin)、替加氟、TS-1、阿糖腺苷、UFT等。

[0276] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括抗病毒剂。抗病毒剂包括利托那韦、羟氯喹等。

[0277] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括极光激酶抑制剂。极光激酶抑制剂包括ABT-348、AZD-1152、MLN-8054、VX-680、Aurora A特异性激酶抑制剂、Aurora B特异性激酶抑制剂和泛极光激酶抑制剂等。

[0278] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括Bcl-2蛋白抑制剂。Bcl-2蛋白抑制剂包括AT-101((-)棉酚)、GENASENSE<sup>®</sup>(G3139或奥利默森(Bcl-2靶向的反义寡核苷酸))、IPI-194、IPI-565、N-(4-(4-((4'-氯(1,1'-联苯基)-2-基)甲基)哌嗪-1-基)苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(二甲基氨基)-1-((苯硫基)甲基)丙基)氨基)-3-硝基苯磺酰胺)(ABT-737)、N-(4-(4-((2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-环己-1-烯-1-基)甲基)哌嗪-1-基)苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(吗啉-4-基)-1-((苯硫基)甲基)丙基)氨基)-3-((三氟甲基)磺酰基)苯磺酰胺)(ABT-263)、GX-070(奥巴克拉(obatoclax))、ABT-199等。

[0279] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括Bcr-Ab1激酶抑制剂,例如DASATINIB<sup>®</sup>(BMS-354825)、GLEEVEC<sup>®</sup>(伊马替尼)等。

[0280] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括CDK抑制剂。CDK抑制剂包括AZD-5438、BMI-1040、BMS-032、BMS-387、CVT-2584、夫拉平度(flavopyridol)、GPC-286199、MCS-5A、PD0332991、PHA-690509、seliciclib(CYC-202,R-roscovitine)、ZK-304709等。

[0281] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共

施用以治疗癌症,包括COX-2抑制剂。COX-2抑制剂包括ABT-963、**ARCOXIA**<sup>®</sup>(依托考昔)、**BEXTRA**<sup>®</sup>(伐地考昔)、BMS347070、**CELEBREX**<sup>®</sup>(塞来考昔)、COX-189(罗美昔布)、CT-3、**DERAMAXX**<sup>®</sup>(地拉考昔)、JTE-522、4-甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-氨基磺酰苯基-1H-吡咯)、MK-663(依托考昔)、NS-398、帕瑞考昔、RS-57067、SC-58125、SD-8381、SVT-2016、S-2474、T-614、**VIOXX**<sup>®</sup>(罗非考昔)等。

[0282] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括其他EGFR抑制剂。EGFR抑制剂包括EGFR抗体、ABX-EGF、抗EGFR免疫脂质体、EGF疫苗、EMD-7200、**ERBITUX**<sup>®</sup>(西妥昔单抗)、HR3、IgA抗体、**IRESSA**<sup>®</sup>(吉非替尼)、**TARCEVA**<sup>®</sup>(厄洛替尼或OSI-774)、TP-38、EGFR融合蛋白、**TYKERB**<sup>®</sup>(拉帕替尼)等。

[0283] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括HER2抑制剂。ErbB2受体抑制剂包括CP-724-714、CI-1033(卡奈替尼)、**HERCEPTIN**<sup>®</sup>(曲妥珠单抗)、**TYKERB**<sup>®</sup>(拉帕替尼)、**OMNITARG**<sup>®</sup>(2C4、帕妥珠单抗)、TAK-165、GW-572016(洛那法尼)、GW-282974、EKB-569、PI-166、dHER2(HER2疫苗)、APC-8024(HER-2疫苗)、抗HER/2neu双特异性抗体、B7.her2IgG3、AS HER2三官能双特异性抗体、mAB AR-209、mAB 2B-1等。

[0284] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括组蛋白去乙酰化酶抑制剂,例如缩酚酸肽、LAQ-824、MS-275、trapoxin、辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)、TSA、丙戊酸等。

[0285] HSP-90抑制剂包括17-AAG-nab、17-AAG、CNF-101、CNF-1010、CNF-2024、17-DMAG、格尔德霉素、IPI-504、KOS-953、**MYCOGRAB**<sup>®</sup>(HSP-90的人重组抗体)、NCS-683664、PU24FC1、PU-3、根赤壳菌素、SNX-2112、STA-9090VER49009等。

[0286] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括凋亡蛋白抑制剂的抑制剂,例如HGS1029、GDC-0145、GDC-0152、LCL-161、LBW-242等。

[0287] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括其他ADC,例如抗CD22-MC-MMAF、抗CD22-MC-MMAE、抗CD22-MCC-DM1、CR-011-vcMMAE、PSMA-ADC、MEDI-547、SGN-19Am SGN-35、SGN-75ADC等。

[0288] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括死亡受体通路激活剂,例如TRAIL、靶向TRAIL或死亡受体(例如DR4和DR5)的抗体或其他试剂如Apomab、西他土珠单抗(conatumumab)、ETR2-ST01、GDC0145、来沙木单抗(lexatumumab)、HGS-1029、LBY-135、PRO-1762和曲妥珠单抗。

[0289] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括驱动蛋白抑制剂,例如Eg5抑制剂如AZD4877、ARRY-520;CENPE抑制剂如GSK923295A等。

[0290] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共

施用以治疗癌症,包括JAK-2抑制剂,例如CEP-701(来他替尼)、XL019和INCB018424等。

[0291] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括MEK抑制剂,例如ARRY-142886、ARRY-438162PD-325901、PD-98059等。

[0292] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括mTOR抑制剂,例如AP-23573、CCI-779、依维莫司、RAD-001、雷帕霉素、替西罗莫司、ATP竞争性TORC1/TORC2抑制剂包括PI-103、PP242、PP30、Torin1等。

[0293] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括非类固醇抗炎药(NSAID),例如 **AMIGESIC<sup>®</sup>**(双水杨酯)、**DOLOBID<sup>®</sup>**(二氟尼柳)、**MOTRIN<sup>®</sup>**(布洛芬)、**ORUDIS<sup>®</sup>**(酮洛芬)、**RELAFEN<sup>®</sup>**(萘布美酮)、**FELDENE<sup>®</sup>**(吡罗昔康)、布洛芬乳膏、**ALEVE<sup>®</sup>**(萘普生)和**NAPROSYN<sup>®</sup>**(萘普生)、**VOLTAREN<sup>®</sup>**(双氯芬酸)、**INDOCIN<sup>®</sup>**(吲哚美辛)、**CLINORIL<sup>®</sup>**(舒林酸)、**TOLECTIN<sup>®</sup>**(托美汀)、**LODINE<sup>®</sup>**(依托度酸)、**TORADOL<sup>®</sup>**(酮咯酸)、**DAYPRO<sup>®</sup>**(奥沙普嗪)等。

[0294] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括PDGFR抑制剂,例如C-451、CP-673、CP-868596等。

[0295] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括铂化疗剂,例如顺铂、**ELOXATIN<sup>®</sup>**(奥沙利铂)依他铂、洛铂、奈达铂、**PARAPLATIN<sup>®</sup>**(卡铂)、沙铂、吡铂等。

[0296] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括polo样激酶抑制剂,例如BI-2536等。

[0297] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)抑制剂,例如渥曼青霉素、LY294002、XL-147、CAL-120、ONC-21、AEZS-127、ETP-45658、PX-866、GDC-0941、BGT226、BEZ235、XL765等。

[0298] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括血小板反应蛋白类似物,例如ABT-510(血小板反应蛋白模拟物)、ABT-567、ABT-898(血小板反应蛋白-1模拟肽)、TSP-1等。

[0299] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括VEGFR抑制剂,例如**AVASTIN<sup>®</sup>**(贝伐单抗)、ABT-869、AEE-788、**ANGIOZYME<sup>™</sup>**(抑制血管生成的核酶(Ribozyme Pharmaceuticals(Boulder,CO.)和Chiron,(Emeryville,CA))、阿西替尼(AG-13736)、AZD-2171、CP-547,632、IM-862、MACUGEN(pegaptamib)、**NEXAVAR<sup>®</sup>**(索拉非尼、BAY43-9006)、帕唑帕尼(GW-786034)、瓦他拉尼(PTK-787、ZK-222584)、**SUTENT<sup>®</sup>**(舒尼替尼、SU-11248)、VEGF trap、**ZACTIMA<sup>™</sup>**(凡德他尼、ZD-6474)、GA101、奥法木单抗、ABT-806(mAb-806)、ErbB3特异性抗体、BSG2特异性抗体、DLL4特异性抗体和C-met特异性抗体等。抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括抗生素,例如嵌入抗生素阿柔比星、放线菌素D、氨柔比星、annamycin、阿霉素、**BLENOXANE<sup>®</sup>**(博来霉素)、道诺霉素、

CAELYX<sup>®</sup>或MYOCET<sup>®</sup>(多柔比星脂质体)、依沙芦星、表柔比星、glarbuicin、ZAVEDOS<sup>®</sup>(伊达比星)、丝裂霉素C、奈莫柔比星、新制癌菌素、培洛霉素、吡柔比星、蝴蝶霉素、stimalamer、链脲菌素、VALSTAR<sup>®</sup>(戊柔比星)、净司他汀等。

[0300] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括拓扑异构酶抑制剂,例如阿柔比星、9-氨基喜树碱、氨茶非特、安吡啶、becatecarin、贝洛替康、BN-80915、CAMPTOSAR<sup>®</sup>(盐酸依立替康)、喜树碱、CARDIOXANE<sup>®</sup>(右旋丙亚胺)、二氟替康、艾特卡林(edotecarin)、ELLEENCE<sup>®</sup>或PHARMORUBICIN<sup>®</sup>(表柔比星)、依托泊苷、依沙替康、10-羟基喜树碱、吉马替康、勒托替康、米托蒽醌、orathecin、吡柔比星、匹克生琼、卢比替康、索布佐生、SN-38、tafluposide、托泊替康等。

[0301] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括治疗性抗体,例如AVASTIN<sup>®</sup>(贝伐单抗)、CD40特异性抗体、chTNT-1/B、迪诺塞麦、ERBITUX<sup>®</sup>(西妥昔单抗)、HUMAX-CD4<sup>®</sup>(扎木单抗)、IGF1R特异性抗体、林妥珠单抗、PANOREX<sup>®</sup>(依决洛单抗)、RENCAREX<sup>®</sup>(WX G250)、RITUXAN<sup>®</sup>(利妥昔单抗)、ticilimumab、曲妥珠单抗、I和II型CD20抗体等。

[0302] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括激素疗法,例如ARIMIDEX<sup>®</sup>(阿那曲唑)、AROMASIN<sup>®</sup>(依西美坦)、阿佐昔芬、CASODEX<sup>®</sup>(比卡鲁胺)、CETROTIDE<sup>®</sup>(西曲瑞克)、地加瑞克、地洛瑞林、DESOPAN<sup>®</sup>(曲洛司坦)、地塞米松、DROGENIL<sup>®</sup>(氟他胺)、EVISTA<sup>®</sup>(雷洛昔芬)、AFEMA<sup>TM</sup>(法倔唑)、FARESTON<sup>®</sup>(托瑞米芬)、FASLODEX<sup>®</sup>(氟维司群)、FEMARA<sup>®</sup>(来曲唑)、福美坦、糖皮质激素类、HECTOROL<sup>®</sup>(度骨化醇)、RENAGEL<sup>®</sup>(碳酸司维拉姆)、拉索昔芬、醋酸亮丙瑞林、MEGACE<sup>®</sup>(甲地孕酮)、MIFEPREX<sup>®</sup>(米非司酮)、NILANDRON<sup>TM</sup>(尼鲁米特)、NOLVADEX<sup>®</sup>(柠檬酸他莫昔芬)、PLENAXIS<sup>TM</sup>(阿巴瑞克)、泼尼松、PROPECIA<sup>®</sup>(非那司提)、rilostane、SUPREFACT<sup>®</sup>(布舍瑞林)、TRELSTAR<sup>®</sup>(促黄体素释放激素(LHRH))、VANTAS<sup>®</sup>(组氨瑞林植入物)、VETORYL<sup>®</sup>(曲洛司坦或modrastane)、ZOLADEX<sup>®</sup>(fosrelin、戈舍瑞林)等。

[0303] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括deltoids和维甲酸类,例如西奥骨化醇(EB1089、CB1093)、lexacalcitrol(KH1060)、芬维A胺、PANRETIN<sup>®</sup>(aliretinoin)、ATRAGEN<sup>®</sup>(脂质体维A酸)、TARGRETIN<sup>®</sup>(贝沙罗汀)、LGD-1550等。

[0304] 抗EGFR ADC (或包含抗EGFR ADC的制剂) 可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症, 包括PARP抑制剂, 例如维利帕尼、奥拉帕尼、KU-59436、AZD-2281、AG-014699、BSI-201、BGP-15、INO-1001、ONO-2231等。

[0305] 抗EGFR ADC (或包含抗EGFR ADC的制剂) 可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症, 包括植物生物碱, 例如但不限于长春新碱、长春碱、长春地辛、长春瑞滨等。

[0306] 抗EGFR ADC (或包含抗EGFR ADC的制剂) 可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症, 包括蛋白酶体抑制剂, 例如**VELCADE**<sup>®</sup> (硼替佐米)、MG132、NPI-0052、PR-171等。

[0307] 抗EGFR ADC (或包含抗EGFR ADC的制剂) 可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症, 包括免疫剂。免疫剂的实例包括干扰素和其他免疫增强剂。干扰素包括干扰素 $\alpha$ 、干扰素 $\alpha$ -2a、干扰素 $\alpha$ -2b、干扰素 $\beta$ 、干扰素 $\gamma$ -1a、**ACTIMMUNE**<sup>®</sup> (干扰素 $\gamma$ -1b) 或干扰素 $\gamma$ -n1、它们的组合等。其他药剂包括**ALFAFERONE**<sup>®</sup>、(IFN- $\alpha$ )、BAM-002 (氧化谷胱甘肽)、**BEROMUN**<sup>®</sup> (他索纳明)、**BEXXAR**<sup>®</sup> (托西莫单抗)、**CAMPATH**<sup>®</sup> (阿仑单抗)、CTLA4 (细胞毒性淋巴细胞抗原4)、氨烯咪胺、地尼白介素、依帕珠单抗、**GRANOCYTE**<sup>®</sup> (来格司亭)、蘑菇多糖、白细胞 $\alpha$ 干扰素、咪喹莫特、MDX-010 (抗CTLA-4)、黑色素瘤疫苗、米妥莫单抗、莫拉司亭、MYLOTARG<sup>™</sup> (吉妥珠单抗奥唑米星)、**NEUPOGEN**<sup>®</sup> (非格司亭)、OncoVAC-CL、**OVAREX**<sup>®</sup> (奥戈伏单抗)、pemtumomab (Y-muHMFg1)、**PROVENGE**<sup>®</sup> (sipuleucel-T)、沙格司亭、裂裯多糖、替西硫津、**THERACYS**<sup>®</sup> (卡介苗)、乌苯美司、**VIRULIZIN**<sup>®</sup> (免疫治疗剂, Lorus Pharmaceuticals)、Z-100 (Specific Substance of Maruyama (SSM))、WF-10 (十氧化四氯 (Tetrachlorodecaoxide) (TCD0))、**PROLEUKIN**<sup>®</sup> (阿地白介素)、**ZADAXIN**<sup>®</sup> (胸腺法新)、**ZENAPAX**<sup>®</sup> (达克珠单抗)、**ZEVALIN**<sup>®</sup> (90Y-替伊莫单抗) 等。

[0308] 抗EGFR ADC (或包含抗EGFR ADC的制剂) 可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症, 包括生物反应调节剂, 例如调节活生物的防御机制或生物反应 (如组织细胞的存活、生长或分化) 以使它们具有抗肿瘤活性的药剂, 包括云芝多糖、蘑菇多糖、西佐糖、溶链菌PF-3512676 (CpG-8954)、乌苯美司等。

[0309] 抗EGFR ADC (或包含抗EGFR ADC的制剂) 可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症, 包括嘧啶类似物, 例如阿糖胞苷 (ara C或阿拉伯糖苷C)、胞嘧啶阿拉伯糖苷、脱氧氟尿苷、**FLUDARA**<sup>®</sup> (氟达拉滨)、5-FU (5-氟尿嘧啶)、氟尿苷、**GEMZAR**<sup>®</sup> (吉西他滨)、**TOMUDEX**<sup>®</sup> (雷替曲塞)、TROXATYL<sup>™</sup> (三乙酰尿苷曲沙他滨) 等。

[0310] 抗EGFR ADC (或包含抗EGFR ADC的制剂) 可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症, 包括嘌呤类似物, 例如**LANVIS**<sup>®</sup> (硫鸟嘌呤) 和**PURI-NETHOL**<sup>®</sup> (巯基嘌呤)。

[0311] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括抗有丝分裂剂,例如batabulin、埃博霉素D(KOS-862)、N-(2-((4-羟基苯基)氨基)吡啶-3-基)-4-甲氧基苯磺酰胺、伊沙匹隆(BMS 247550)、紫杉醇、**TAXOTERE**<sup>®</sup>(多西他赛)、PNU100940(109881)、帕土匹龙、XRP-9881(拉洛他赛)、长春氟宁、ZK-EP0(合成埃博霉素)等。

[0312] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括泛素连接酶抑制剂,例如MDM2抑制剂如nutlin、NEDD8抑制剂如MLN4924等。

[0313] 本发明的化合物还可用作提高放疗效力的放射增敏剂。放疗的实例包括外照射放疗、远距放射疗法、短距离放射治疗和密封、非密封源的放射治疗等。

[0314] 抗EGFR ADC(或包含抗EGFR ADC的制剂)可以与治疗有效量的一种或多种药剂共施用以治疗癌症,包括化疗剂例如ABRAXANE<sup>™</sup>(ABI-007)、ABT-100(法尼基转移酶抑制剂)、**ADVEXIN**<sup>®</sup>(Ad5CMV-p53疫苗)、**ALTOCOR**<sup>®</sup>或**MEVACOR**<sup>®</sup>(洛伐他汀)、**AMPLIGEN**<sup>®</sup>(聚I:聚C12U,一种合成RNA)、**APTOSYN**<sup>®</sup>(依昔舒林)、**AREDIA**<sup>®</sup>(帕米膦酸)、arglabin、L-天冬酰胺酶、阿他美坦(1-甲基-3,17-二酮-雄甾-1,4-二烯)、**AVAGE**<sup>®</sup>(他扎罗汀)、AVE-8062(考布他汀衍生物)BEC2(米妥莫单抗)、恶病质素或cachexin(肿瘤坏死因子)、卡伐辛(疫苗)、**CEAVAC**<sup>®</sup>(癌症疫苗)、**CELEUK**<sup>®</sup>(西莫白介素)、**CEPLENE**<sup>®</sup>(二盐酸组胺)、**CERVARIX**<sup>®</sup>(人乳头状瘤病毒疫苗)、**CHOP**<sup>®</sup>(C:**CYTOXAN**<sup>®</sup>(环磷酰胺);H:**ADRIAMYCIN**<sup>®</sup>(羟基阿霉素);0:长春新碱(**ONCOVIN**<sup>®</sup>);P:泼尼松)、CYPAT<sup>™</sup>(醋酸环丙孕酮)、考布他汀A4P、DAB(389)EGF(通过组氨酸-丙氨酸接头与人表皮生长因子融合的白喉毒素的催化和易位结构域)或TransMID-107R<sup>™</sup>(白喉毒素)、氮烯唑胺、更生霉素、5,6-二甲基咕吨酮-4-醋酸(DMXAA)、恩尿嘧啶、EVIZON<sup>™</sup>(角鲨胺乳酸盐)、**DIMERICINE**<sup>®</sup>(T4N5脂质体洗剂)、圆皮海绵内酯、DX-8951f(依沙替康甲磺酸酯)、enzastaurin、EP0906(埃博霉素B)、**GARDASIL**<sup>®</sup>(四价人乳头状瘤病毒(6、11、16、18型)重组疫苗)、**GASTRIMMUNE**<sup>®</sup>、**GENASENSE**<sup>®</sup>、GMK(神经节苷脂结合疫苗)、**GVAX**<sup>®</sup>(前列腺癌疫苗)、哈洛夫酮、组氨瑞林、羟基脲、伊班膦酸、IGN-101、IL-13-PE38、IL-13-PE38QQR(cintredekin besudotox)、IL-13-假单胞菌外毒素、干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\gamma$ 、JUNOVAN<sup>™</sup>或MEPACT<sup>™</sup>(米伐木肽)、洛那法尼、5,10-亚甲基四氢叶酸、米替福新(十六烷胆碱磷酸)、**NEOVASTAT**<sup>®</sup>(AE-941)、**NEUTREXIN**<sup>®</sup>(三甲曲沙葡萄糖醛酸)、**NIPENT**<sup>®</sup>(喷司他丁)、**ONCONASE**<sup>®</sup>(核糖核酸酶)、**ONCOPHAGE**<sup>®</sup>(黑色素瘤疫苗治疗)、**ONCOVAX**<sup>®</sup>(IL-2疫苗)、ORATHECIN<sup>™</sup>(卢比替康)、**OSIDEM**<sup>®</sup>(基于抗体的细胞药物)、**OVAREX**<sup>®</sup>MAb(鼠单克隆抗体)、紫杉醇、PANDIMEX<sup>™</sup>(来自人参的包含20(S)原人参萜二醇(aPPD)和20(S)原人参萜三醇(aPPT)的糖

昔皂昔)、帕尼单抗、**PANVAC**<sup>®</sup>-VF(调查性癌症疫苗)、培加帕酶、PEG干扰素A、苯妥帝尔(phenoxodiol)、普鲁苳肼、瑞马司他、**REMOVAB**<sup>®</sup>(卡妥索单抗)、**REVLIMID**<sup>®</sup>(来那度胺)、RSR13(乙丙昔罗)、**SOMATULINE**<sup>®</sup>LA(兰乐肽)、**SORIATANE**<sup>®</sup>(阿昔曲丁)、十字孢碱(星形孢子链霉菌)、talabostat (PT100)、**TARGRETIN**<sup>®</sup>(贝沙罗汀)、**TAXOPREXIN**<sup>®</sup>(DHA-紫杉醇)、**TELCYTA**<sup>®</sup>(canfosfamide、TLK286)、temilifene、**TEMODAR**<sup>®</sup>(替莫唑胺)、替米利芬、沙利度胺、**THERATOPE**<sup>®</sup>(STn-KLH)、thymitaq(2-氨基-3,4-二氢-6-甲基-4-氧代-5-(4-吡啶硫代)喹唑啉酮二盐酸盐)、TNFERADE<sup>™</sup>(腺病毒载体:包括肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的基因的DNA载体)、**TRACLEER**<sup>®</sup>或**ZAVESCA**<sup>®</sup>(波生坦)、维A酸(维-A)、粉防乙碱、**TRISENOX**<sup>®</sup>(三氧化二砷)、**VIRULIZIN**<sup>®</sup>、ukrain(来自高等白屈菜植物的生物碱的衍生物)、vitaxin(抗 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体)、**XCYTRIN**<sup>®</sup>(莫特沙芬钆)、XINLAY<sup>™</sup>(阿曲生坦)、XYOTAX<sup>™</sup>(聚谷氨酸紫杉醇)、**YONDELIS**<sup>®</sup>(曲贝替定)、ZD-6126、**ZINECARD**<sup>®</sup>(右丙亚胺)、**ZOMETA**<sup>®</sup>(唑来膦酸)、佐柔比星等。

[0315] 在一个实施方案中,向患有胶质母细胞瘤的受试者与辐射和/或**TEMODAR**<sup>®</sup>(替莫唑胺)联合静脉内施用包含抗EGF-ADC的制剂。

[0316] 进一步地,在一个实施方案中,制剂可以作为包含以下的药物试剂盒提供:(a)包含冻干形式的抗EGFR ADC的容器和(b)包含注射用药学上可接受的稀释剂(如无菌水)的第二容器。药学上可接受的稀释剂可用于重构或稀释冻干的ADC。任选与这些容器结合的可以是以管理医药或生物产品的生产、使用或销售的政府部门规定的形式的通告,所述通告反映生产、使用或销售部门批准向人施用。

[0317] 本发明进一步在以下不意欲限制本发明范围的实施例中描述。

#### [0318] 实施例

[0319] 实施例1:抗体药物偶联物(ADC)的稳定性测试

[0320] 以下实施例描述了用于分析某些ADC(液体形式)与未偶联抗体相比的稳定性的测试。测试了与MMAF(参见图2)(以下称为“ADC1-MMAF”,其为人源化抗EGFR抗体1-MMAF偶联物)或MMAE(参见图1)(以下称为“ADC1-MMAE”,其为人源化抗EGFR抗体1-MMAE偶联物)偶联的抗体,并与单独的人源化抗EGFR抗体1比较。检验的性质包括展开温度的开始(使用动态扫描荧光法和DSC)、二级和三级结构分析(分别通过FTIR和近UV-CD)、在低浓度和高浓度下的加速稳定性、血清稳定性、在低浓度和高浓度下的冻/融稳定性和溶解度。在这个实施例中所述的制剂是液体制剂。

[0321] 使用动态扫描荧光法(DSF)和差示扫描量热法(DSC)分析展开的开始

[0322] 使用两种不同的技术,即动态扫描荧光法(DSF)和差示扫描量热法(DSC)来测定在热变性期间抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的展开开始和构象稳定性。如图3A中所示,荧光强度的变化与蛋白展开水平和温度相关。比较热稳定性测量的结果和用DSC所得的数据(图3B)。超过55℃的温度下的蛋白质展开用作稳定性的量度。如图3A和B所示,ADC1-MMAE(46

℃) 展开开始的温度低于ADC1-MMAF (55℃), 且抗体1展开开始的温度最高 (61℃), 说明抗体1是三种分子中最稳定的。因此, 与单独的抗体1相比, 如ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的较低展开温度反映的, ADC显示热动态稳定性降低。

[0323] 抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的二级和三级结构分析

[0324] 用傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 和近UV-圆二色性 (CD) 测定抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的稳定性。已经表明, 260和约180nm之间的CD谱可分析不同的二级结构类型:  $\alpha$ 螺旋、平行和反平行的 $\beta$ 折叠、转角和其他。用FTIR (图4A) 和CD (图4B) 监测在pH 5/6/7下单独的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液中抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的二级结构的变化。如图4A和4B所示, 与抗体1相比, ADC1-MMAE和ADC1-MMAF的物理特性在非结构化元件中有略微改变。如图4A中的FTIR数据所证实的, 与单独的抗体1相比, ADC1-MMAE和ADC1-MMAF也有略微改变的非结构元件。但总体上, 三个分子各自在 $1638\text{cm}^{-1}$ 显示存在>40%的 $\beta$ 折叠。CD结果显示ADC1-MMAE的谱与ADC1-MMAF和抗体1不同 (图4B)。但总体上, 分子各自在280nm处显示具有负椭圆率的S形谱。

[0325] 抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的加速稳定性研究

[0326] 加速稳定性研究有助于提供对环境短期暴露的效果 (其另外地通常在长时间内发生) 的信息。在pH 6的10mM柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液中以低浓度 (1mg/ml) 和在pH 5.75的15mM组氨酸中以高浓度 (60mg/ml) 配制抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE。稳定性定义为在40℃、最稳定的pH下7天后单体损失小于5%。

[0327] 这些研究的结果如图5和图6中所示。图5显示在初始时间点 (T0) 和在40℃下储存7天后的聚集 (作为%聚集体; 通过SEC分析测定)。图5显示, 在1mg/ml的浓度下, 与ADC1-MMAF和抗体1相比, ADC1-MMAE在低浓度下具有增强的聚集倾向。图6显示在初始时间点 (T0) 和在40℃下储存7天后的聚集 (作为%聚集体)。图6显示, 在60mg/ml的浓度下, 与ADC1-MMAF和抗体1相比, ADC1-MMAE在高浓度下具有显著增强的聚集倾向。并且, 已知的稳定剂例如羟丙基- $\beta$ -环糊精 (图6中标记为“HPBCD”) 对聚集没有影响。

[0328] 抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的血浆稳定性

[0329] 血浆稳定性在药物发现和开发中具有重要作用, 因为不稳定的化合物倾向于具有快速清除率和短的半衰期, 从而造成差的体内性能。在血清稳定性分析中评估抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的体外血清稳定性。简单地, 用AexaFlur® (Life Technologies) 标记抗体。然后在过滤的血清中孵育标记的抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE。在第0、1、3、5、7天收集样品, 并用尺寸排阻色谱法 (SEC) 分析。计算第0-7天之间的高分子量 (HMW) 聚集体百分比的斜率。稳定性定义为每天少于1%的HMW种类。因此, 斜率越小, 存在的聚集越少。更具体地, 图7的图表表明, ADC1-MMAF的斜率 (0.5%) 小于抗体1 (1.10%) 和ADC1-MMAE (2.30), 因此表明较少的聚集和较好的血浆稳定性。出于对比的目的, 图7还描述了一些其他分子, 例如抗体和DVD-Ig的HMW聚集体百分比的斜率。

[0330] 高浓度和低浓度的抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的冻/融稳定性

[0331] 抗体的聚集可以被冻融和升高的温度 (开发、生产和储存过程中典型的压力因素) 诱导。将抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE经受0、1或2个冻融循环, 并用光谱学技术 (SEC) 表征。在pH为5.75的15mM组氨酸缓冲液中配制高浓度的抗体1 (210mg/ml)、ADC1-MMAF (135mg/ml) 和ADC1-MMAE (145mg/ml)。表示%单体 (由SEC测定) 的结果示于图8A中, 并表明在三种分

子之间没有聚集(定义为2个F/T循环后<2%的HMW种类增加)的变化。在图8B所示的实验中,在pH为7.0的10mM柠檬酸盐和10mM磷酸盐缓冲液中以1mg/ml的浓度配制相同浓度的抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE。如图8A和8B中所示,高浓度或低浓度下抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE之间在1个或2个冻/融循环后,冻/融稳定性没有显著变化。

[0332] 还测试了冻融(0、1或2个冻融循环)期间在单独pH为6的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液中的浓度为1mg/ml的三种分子的颗粒形成。显微颗粒(分别是 $\geq 10\mu\text{m}$ 和 $\geq 25\mu\text{m}$ )测定为低于药典限值(分别是 $\geq 10\mu\text{m}$ 且小于或等于600/Ml( $\geq 25\mu\text{m}$ ))(图9A)。还使用微流成像(MFI)检测并定量显微颗粒(小于10微米)(图9B)。图9A和9B描述了随时间抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的显微颗粒的总体增加。

[0333] 抗体1相对于带MMAF或MMAE的ADC1的溶解度

[0334] 于5℃下检验在pH为6的包含10mM柠檬酸盐和10mM磷酸盐缓冲系统的制剂中抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE的溶解度。溶解度定义为当以浓度至少50mg/ml配制时,溶液没有沉淀。按如下测定抗体1、ADC1-MMAF和ADC1-MMAE各自的溶解度:抗体1 $>210\text{mg/mL}$ ;ADC 1-MMAF: $>135\text{mg/mL}$ (来源1);ADC 1-MMAF: $>92\text{mg/mL}$  A(来源2);ADC 1-MMAE: $>145\text{mg/mL}$ (来源1);和ADC 1-MMAE: $>116\text{mg/mL}$ (来源2)。注意溶解度可能超过上述提及的浓度,因为有限材料防止进一步的浓缩(concentration)。

[0335] 结论

[0336] 总体上,如所述的,ADC1-MMAF和ADC1-MMAE显示的稳定性低于非偶联的抗体1,例如在本文所述的加速研究和展开试验中。

[0337] 实施例2:ADC1-MMAF稳定冻干制剂

[0338] ADC1-MMAF是包含与MMAF共价连接的抗体1的抗EGFR抗体药物偶联物。将ADC1-MMAF配制成冻干粉用于在重构和装入玻璃小瓶后注射。用5mL注射用无菌水(SWFI)重构冻干粉,并提供用于注射的20mg/ml的ADC1-MMAF溶液。药物产品制剂用于单次使用,且不含防腐剂。下表1描述了每小瓶(冻干粉)和每mL(重构溶液)的ADC1-MMAF的组成。用0.9%的生理盐水(氯化钠注射液,USP)稀释重构的药品用于通过输液的剂量施用。

[0339] 表1. 用于注射液,20mg/ml的ADC1-MMAF粉末的组成

[0340]

成分名称	功能	每小瓶量(mg)	重构的量(mg/mL)
ADC 1-MMAF	药物物质	105	20
组氨酸	缓冲剂	12	2.3
蔗糖	增容剂	368	70
聚山梨醇酯 80	表面活性剂	0.53	0.10
盐酸 <sup>a</sup>	调节 pH	q.s.	q.s.
注射用水/多种注射用水	媒介	不适用 <sup>b</sup>	达到总重量 1032 mg

[0341] a. 以10%溶液使用

[0342] b. 冷冻干燥后不存在

[0343] 表1中所述的制剂是其中偶联物是阿里他汀衍生物例如MMAF的抗EGFR ADC的冻干

制剂典型的。所述制剂包含缓冲剂、糖、表面活性剂和抗EGFR抗体药物偶联物。

[0344] 实施例3-5描述测试实施例2中所述的冻干ADC1-MMAF的稳定性研究。实施例6-8描述测试实施例2中所述的纯化冻干ADC1-MMAF的稳定性研究。为了稳定性研究,将ADC1-MMAF (或ADC1-MMAFp) 作为冻干物储存于20ml无色玻璃小瓶中,用灰色橡胶塞和灰色塑料盖封闭。为了稳定性测试,将ADC1-MMAF (或ADC1-MMAFp) 储存于以下三种不同条件下:5℃;25℃ (60%相对湿度);40℃ (75%相对湿度)。

[0345] 实施例3:冻干制剂中ADC1-MMAF在5℃的稳定性

[0346] 在初始时间点用SWFI重构之后以及在将冻干物于5℃储存长达18个月后重构之后进行以下实验。

[0347] 5℃下长期储存不影响冻干物和重构溶液的外观

[0348] 用视觉评估冻干物和重构溶液的外观以确认冻干物实际上不含肉眼可见的外来颗粒物质,且在包装材料中不含水分。在初始时间点以及在5℃下储存长达12个月后重构之后,冻干物的外观符合上述标准。在5℃下储存长达12个月后重构之后,重构溶液是无色至微黄色的溶液,且实际上不含肉眼可见的颗粒物质。

[0349] 5℃下长期储存不影响溶液颜色

[0350] 用蓝/黄标尺(BY标尺)评估重构溶液的颜色(肉眼可见),其中将样品相对参考溶液测试并报告值。在初始时间点以及在5℃下储存长达12个月后重构之后,所有重构溶液的BY标尺测量值小于或等于7。因此,储存不影响溶液颜色。

[0351] 5℃下长期储存不影响溶液的清晰度和乳浊度

[0352] 通过标准比浊计使用光散射原理按照相应的Ph.Eur.或USP方法测量重构溶液的清晰度和乳浊度(实施例4-8也这样做)。在初始时间点以及在5℃下储存长达12个月后重构之后,重构溶液的外观没有比参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur)具有更高乳浊度(<=RSII)。

[0353] 5℃下长期储存不影响溶液的蛋白含量

[0354] 测定重构溶液的蛋白质含量。用280nm的波长和ADC1-MMAF的消光系数(1.43)通过分光光度法测定ADC的蛋白质浓度(实施例4-8也这样做)。在初始时间点,重构溶液的蛋白质含量为18.8mg/ml。在5℃下储存3个月后重构之后,重构溶液的蛋白质含量为20.2mg/ml。

[0355] 5℃下长期储存不影响溶液的生物活性

[0356] 使用人表皮样癌细胞系的细胞毒性试验用于测试重构溶液相对于之前已经确认为具有细胞毒性活性的ADC1-MMAF对照(对照具有100%的活性)的生物活性(%)。在初始时间点,相对生物活性为109%。在5℃下储存1个月后重构之后,相对生物活性为105%。在5℃下储存3个月后重构之后,相对生物活性为97%。在5℃下储存6个月后重构之后,相对生物活性为108%。在5℃下储存9个月后重构之后,相对生物活性为105%。在5℃下储存12个月后重构之后,相对生物活性为99%。在5℃下储存18个月后重构之后,相对生物活性为112%。

[0357] 5℃下长期储存不影响分子和/或分子复合物的尺寸

[0358] 使用尺寸排阻-高效液相色谱法(SE-HPLC)进行重构溶液的尺寸排阻色谱。SE-HPLC使用尺寸排阻HPLC测定ADC1-MMAF的纯度。大分子在凝胶过滤HPLC期间根据减小的分子尺寸被等度分离。通过比较ADC1-MMAF主峰的面积与样品色谱图的总面积(不包括缓冲剂

相关的峰)来测定纯度。该方法能够从ADC1-MMAF主峰解析高分子量聚集体和截短的抗体种类。该方法也用于实施例4-8。

[0359] 除了高分子量种类(%)和低分子量种类(%),还测量主峰(%)。在初始时间点,主峰是98.9%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.2%。

[0360] 在5℃下储存1个月后重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.2%。

[0361] 在5℃下储存3个月后重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是1.0%,低分子量种类是0.2%。

[0362] 在5℃下储存6个月后重构之后,主峰是99.0%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.2%。

[0363] 在5℃下储存9个月后重构之后,主峰是98.9%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.3%。

[0364] 在5℃下储存12个月后重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是0.8%,和低分子量种类是0.4%。

[0365] 在5℃下储存18个月后重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.3%。

[0366] 因此,在初始时间点、1个月、3个月、6个月、9个月、12个月和18个月时间点的测量中,所有时间点的主峰%以及高分子量和低分子量种类的变化非常小或没有变化。

[0367] 5℃下长期储存不改变溶液的色谱峰

[0368] 使用高效液相色谱法对重构溶液进行阳离子交换色谱(CEX)(CEX-HPLC)。在阳离子交换色谱中,带正电荷的分子被吸引到带负电荷的固体支持物。阳离子交换(CEX-HPLC)色谱分析是基于电荷的分离方法,其通过与参考标准(之前表征过的ADC1-MMAF)对比来监测测试样品中ADC1-MMAF的稳定性。该方法能够从酸性和碱性物质解析主峰。

[0369] 在初始时间点以及在5℃下储存长达18个月后重构之后,通过与对照(其为之前表征过的ADC1-MMAF)相符的样品主要色谱峰模式来表征重构溶液的外观。因此,在5℃下18个月的过程中,色谱峰保持相对不变。

[0370] 5℃下长期储存不影响溶液的纯度

[0371] 在初始时间点以及在5℃下储存长达18个月后重构之后,对重构溶液进行毛细管凝胶电泳(CE-SDS-R)来测定溶液纯度。在初始时间点,百分纯度为97.4%。在5℃下储存1个月然后重构之后,纯度百分比为97.6%。在5℃下储存3个月后重构之后,纯度百分比为96.9%。在5℃下储存6个月后重构之后,纯度百分比为97.1%。在5℃下储存9个月后重构之后,纯度百分比为96.7%。在5℃下储存12个月后重构之后,纯度百分比为97.2%。在5℃下储存18个月后重构之后,纯度百分比为97.3%。因此,重构溶液的纯度在初始时间点与重构之后长达18个月之间没有显著变化。

[0372] 5℃下长期储存后溶液的药物-抗体比率没有变化

[0373] 对重构溶液进行疏水相互作用色谱(HIC)以测定在18个月期间的药物-抗体比率(DAR)。HIC用来根据相对疏水性分离蛋白。HIC方法是ADC1-MMAF的疏水性的测量。通过用梯度降低流动相的盐浓度按照疏水性增加的顺序从配体上洗脱结合成分。对于ADC1-MMAF,从柱上洗脱的第一峰是未偶联的抗体。其余峰代表每个抗体上增加数目的药物-接头分子。因

此,通过峰保留时间和相对峰面积测定每抗体的药物-接头数目。该方法也用于实施例4-8中。在初始时间点以及在5℃下储存长达18个月后的重构之后,所有重构溶液的药物-抗体比率(DAR)测量为4.1-4.2。

[0374] 5℃下长期储存后溶液中未偶联抗体百分比没有变化

[0375] 还使用上述用于测定DAR的HIC方法分析重构溶液以测定ADC1-MMAF的未偶联抗体百分比(且也用于实施例4-8)。在初始时间点,百分比不超过4.1。在5℃下储存1个月后的重构之后,百分比不超过4.1。在5℃下储存3个月后的重构之后,百分比不超过4.1。在5℃下储存6个月后的重构之后,百分比不超过3.9。在5℃下储存9个月后的重构之后,百分比不超过4.0。在5℃下储存12个月后的重构之后,百分比不超过4.0。在5℃下储存18个月后的重构之后,百分比不超过4.0。因此,所有时间点的百分比是相似的。

[0376] 5℃下长期储存没有改变溶液中淬灭的药物接头的百分比

[0377] 对重构溶液进行反相色谱(RP-HPLC)以测定淬灭药物接头的百分比。RP-HPLC是根据分子与疏水性基质的相互作用(这很大程度上基于它们的极性)的分子分离。该方法测定淬灭的药物接头的质量以及溶液中的总杂质。通过用甲醇沉淀然后离心从样品中除去ADC1-MMAF。通过使用带214nm的UV检测的C18柱的RP-HPLC分析上清液中淬灭的药物接头和总杂质。该方法也用于实施例4-8中。

[0378] 在初始时间点,百分比不超过0.007。在5℃下储存1个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在5℃下储存3个月后的重构之后,百分比不超过0.006。在5℃下储存6个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在5℃下储存9个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在5℃下储存12个月后的重构之后,百分比不超过0.007。在5℃下储存18个月后的重构之后,百分比不超过0.005。因此,所有时间点的淬灭的药物接头的百分比是相似的。

[0379] 5℃下长期储存后溶液中的总杂质没有变化

[0380] 还使用对于淬灭的接头的百分比的上述方法,采用RP-HPLC分析重构溶液以测定总杂质百分比(也用于实施例4-8中)。在初始时间点,百分比不超过0.007。在5℃下储存1个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在5℃下储存3个月后的重构之后,百分比不超过0.006。在5℃下储存6个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在5℃下储存9个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在5℃下储存12个月后的重构之后,百分比不超过0.007。在5℃下储存18个月后的重构之后,百分比不超过0.005。因此,所有时间点的总杂质百分比是相似的。

[0381] 5℃下长期储存不影响溶液中的颗粒污染

[0382] 通过测定显微颗粒评估颗粒污染。通过测定每个容器中超过10μm的颗粒数(不超过6000)满足可接受的标准(USP(US药典)和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过10μm的颗粒数是33。在5℃下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是22。在5℃下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是25。在5℃下储存6个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是73。在5℃下储存12个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是20。因此,所有时间点的每个容器中超过10μm的颗粒数满足可接受的标准。

[0383] 也通过测定每个容器中超过25μm的颗粒数(NMT为600)满足可接受的标准(USP(US药典)和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在5℃下储存1

个月后的重构之后,每个容器中超过25 $\mu$ m的颗粒数是2。在5℃下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过25 $\mu$ m的颗粒数是2。在5℃下储存6个月后的重构之后,每个容器中超过25 $\mu$ m的颗粒数是10。在5℃下储存12个月后的重构之后,每个容器中超过25 $\mu$ m的颗粒数是3。因此,所有时间点的每个容器中超过25 $\mu$ m的颗粒数满足可接受的标准。

[0384] 5℃下长期储存不影响溶液的水含量

[0385] 用Karl-Fischer滴定评估水含量。Karl-Fischer滴定使用电量或体积滴定来测定样品中痕量的水,以百分比表示。在初始时间点,重构溶液中的水百分比为2.0%。在5℃下储存3个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.7%。在5℃下储存6个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.7%。在5℃下储存12个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.8%。因此,在初始时间点以及在5℃下储存1个月、3个月、6个月和12个月后的重构之后,重构溶液中的水含量可忽略。

[0386] 5℃下长期储存不影响溶液的pH

[0387] 在初始时间点以及在5℃下储存1个月、3个月、6个月和12个月后的重构之后测定重构溶液的pH。在初始时间点,重构溶液的pH值是6.0。在5℃下储存3个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。在5℃下储存6个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。在5℃下储存12个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。

[0388] 5℃下长期储存不影响溶液的渗透压

[0389] 在初始时间点以及在5℃下储存1个月后的重构之后通过测量每千克溶剂中溶质的平均毫渗量值(mOsmol/kg)来测定重构溶液的渗透压。在初始时间点,摩尔渗透压浓度是235mOsmol/kg。在一个月时,摩尔渗透压浓度是251mOsmol/kg。

[0390] 实施例4:冻干制剂中ADC1-MMAF在25℃下的稳定性

[0391] 在初始时间点用SWFI重构之后以及在将冻干物于25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后进行以下测试。

[0392] 25℃下长期储存不影响冻干物和重构溶液的外观

[0393] 视觉评估冻干物和重构溶液的外观以确认冻干物实际上不含肉眼可见的外来颗粒物质,且在包装材料中不含水分。在初始时间点以及在25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,冻干物的外观符合上述标准。重构后,重构溶液是无色至微黄色的溶液,实际上不含肉眼可见的颗粒物质。因此,在初始时间点以及在25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,重构溶液的外观是无色至微黄色的溶液,实际上不含肉眼可见的颗粒物质。

[0394] 25℃下长期储存不影响溶液颜色

[0395] 用蓝/黄(BY)标尺评估重构溶液的颜色(目视),其中将样品再次相对参考溶液测试并报告值。在初始时间点以及在25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,所有重构溶液的BY标尺测量值小于或等于7。因此,储存不影响溶液颜色。

[0396] 25℃下长期储存不影响溶液的澄清度和乳浊度

[0397] 评估重构溶液的澄清度和乳浊度。如果重构溶液乳浊度不高于参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur),则满足重构溶液的可接受标准。在初始时间点以及在25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,重构溶液的外观没有比参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur)高的乳浊度( $\leq$ RSII)。

[0398] 25℃下长期储存不影响溶液的生物活性

[0399] 使用人表皮样癌细胞系的细胞毒性试验用于测试重构溶液相对于之前已经确认为具有细胞毒性活性的ADC1-MMAF对照(对照具有100%的活性)的生物活性(%)。在初始时间点,相对生物活性为109%。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,相对生物活性为113%。在25℃/60%相对湿度下储存3个月后的重构之后,相对生物活性为103%。在25℃/60%相对湿度下储存6个月后的重构之后,相对生物活性为109%。

[0400] 25℃下长期储存不影响分子和/或分子复合物的尺寸

[0401] 使用尺寸排阻-高效液相色谱法(SE-HPLC)进行重构溶液的尺寸排阻色谱。除了高分子量种类(%)和低分子量种类(%)外,还测量主峰(%)。在初始时间点,主峰是98.9%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.2%。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是1.0%,和低分子量种类是0.2%。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是1.0%,和低分子量种类是0.2%。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,主峰是98.9%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.2%。因此,在初始、1个月、3个月和6个月的测量中,主峰%以及高分子量和低分子量种类的变化非常小或没有变化。

[0402] 25℃下长期储存不改变溶液的色谱峰

[0403] 使用高效液相色谱法(CEX-HPLC)对重构溶液进行阳离子交换色谱(CEX)。在初始时间点以及在25℃/60%相对湿度下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,通过与对照标准相符的样品主要色谱峰模式来表征重构溶液的外观。

[0404] 25℃下长期储存不影响溶液的纯度

[0405] 在初始时间点以及在25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,对重构溶液进行毛细管凝胶电泳(CE-SDS-R)。在初始时间点,纯度百分比为97.4%。在储存1个月后的重构之后,纯度百分比为97.4%。在储存3个月后的重构之后,纯度百分比为96.9%。在储存6个月后的重构之后,纯度百分比为97.1%。因此,重构溶液的纯度在初始时间点与在25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构时和之后之间没有显著变化。

[0406] 25℃下长期储存后溶液的药物-抗体比率没有变化

[0407] 对重构溶液进行疏水相互作用色谱(HIC)。在初始时间点以及在25℃(60%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,所有重构溶液的DAR测量为4.2。

[0408] 25℃下长期储存后溶液中未偶联抗体百分比没有变化

[0409] 分析重构溶液以测定未偶联抗体百分比。在初始时间点,该百分比不超过4.1。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,百分比不超过4.1。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,百分比不超过4.1。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,百分比不超过3.9。

[0410] 25℃下长期储存没有改变溶液中淬灭的药物接头的百分比

[0411] 对重构溶液进行反相色谱(RP-HPLC)以测定淬灭的药物接头的百分比。在初始时间点,该百分比不超过0.007。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,百分比不超过0.006。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,百分比不超过0.005。因此,所有时间点的淬

灭药物接头的百分比是相似的。

[0412] 25℃下长期储存后溶液中的总杂质没有变化

[0413] 分析重构溶液以测定总杂质百分比。在初始时间点,该百分比不超过0.007。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,百分比不超过0.006。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,百分比不超过0.005。因此,所有时间点的总杂质百分比是相似的。

[0414] 25℃下长期储存不影响溶液的颗粒污染

[0415] 通过测定显微颗粒评估颗粒污染。通过确定每个容器中超过10μm的颗粒数(不超过6000)满足可接受的标准(USP(US药典)和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过10μm的颗粒数是33。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是18。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是25。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是50。因此,所有时间点每个容器中超过10μm的颗粒数满足可接受的标准。还通过测定每个容器中超过25μm的颗粒数(不超过600)也满足可接受的标准。在初始时间点,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是2。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是2。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是2。因此,所有时间点每个容器中超过25μm的颗粒数满足可接受的标准。

[0416] 25℃下长期储存不影响溶液的水含量

[0417] 用Karl-Fischer滴定评估水含量。在初始时间点,重构溶液中的水百分比为2.0%。在25℃(60%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为不可检测的。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.8%。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.9%。因此,在初始时间点以及在储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,重构溶液中的水含量可忽略。

[0418] 25℃下长期储存不影响溶液的pH

[0419] 在初始时间点以及在25℃(60%相对湿度)下储存3个月和6个月后的重构之后测定重构溶液的pH。在初始时间点,重构溶液的pH值是6.0。在25℃(60%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。在25℃(60%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。

[0420] 实施例5:冻干制剂中ADC1-MMAF在40℃下的稳定性

[0421] 在初始时间点用SWFI重构实施例2所述的冻干ADC1-MMAF制剂之后以及在将冻干物于40℃/(75%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后进行以下测试。

[0422] 40℃下长期储存不影响冻干物和重构溶液的外观

[0423] 视觉评估冻干物和重构溶液的外观以确认冻干物实际上不含肉眼可见的外来颗粒物质,且在包装材料中不含水分。在初始时间点以及在40℃(75%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,冻干物的外观符合上述标准。重构后,重构溶液是无色至微黄色的溶液,实际上不含肉眼可见的颗粒物质。在初始时间点以及在40℃(75%相对湿

度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,重构溶液的外观是无色至微黄色的溶液,实际上不含肉眼可见的颗粒物质。

[0424] 40℃下长期储藏不影响溶液颜色

[0425] 用BY标尺评估重构溶液的颜色(目视),其中将样品再次相对参考溶液测试并报告值。在初始时间点以及在40℃(75%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,所有重构溶液的BY标尺测量值小于或等于7。因此,储存不影响溶液颜色。

[0426] 40℃下长期储存不影响溶液的澄清度和乳浊度

[0427] 评估重构溶液的澄清度和乳浊度。如果重构溶液乳浊度不高于参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur),则满足重构溶液的可接受标准。在初始时间点以及在40℃(75%相对湿度)下储存1个月、个月和6个月后的重构之后,重构溶液的外观没有比参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur)高的乳浊度( $\leq$ RSII)。

[0428] 40℃下长期储存不影响溶液的生物活性

[0429] 使用人表皮样癌细胞系的细胞毒性试验用于测试重构溶液相对于之前已经确认为具有细胞毒性活性的ADC1-MMAF对照(对照具有100%的活性)的生物活性(%)。在初始时间点,生物活性为109%。在40℃(75%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,相对生物活性为117%。在40℃(75%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,相对生物活性为113%。在40℃(75%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,相对生物活性为110%。因此,所有时间点的生物活性百分比具有超过100%的生物活性。

[0430] 40℃下长期储存不影响分子和/或分子复合物的尺寸

[0431] 使用尺寸排阻-高效液相色谱法(SE-HPLC)进行尺寸排阻色谱。除了高分子量种类(%)和低分子量种类(%),还测量主峰(%)。在初始时间点,主峰是98.9%。高分子量种类是0.9%,和低分子量种类是0.2%。在40℃(75%相对湿度)下储存1个月后的重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是1.0%,和低分子量种类是0.2%。在40℃(75%相对湿度)下储存3个月后的重构之后,主峰是98.7%。高分子量种类是1.1%,和低分子量种类是0.2%。在40℃(75%相对湿度)下储存6个月后的重构之后,主峰是98.8%。高分子量种类是1.0%,和低分子量种类是0.2%。因此,在初始、1个月、3个月和6个月的测量中,主峰%以及高分子量和低分子量种类的变化非常小或没有变化。

[0432] 40℃下长期储存不改变溶液的色谱峰

[0433] 使用高效液相色谱法(CEX-HPLC)进行阳离子交换色谱(CEX)。在初始时间点以及在40℃(75%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,通过与对照标准相符的样品主要色谱峰模式来表征重构溶液的外观。

[0434] 长期储存不影响溶液的纯度

[0435] 在初始时间点以及在40℃(75%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,对重构溶液进行毛细管凝胶电泳(CE-SDS-R)并测定溶液的百分纯度。在初始时间点,百分纯度为97.4%。在储存1个月后的重构之后,百分纯度为97.5%。在储存3个月后的重构之后,百分纯度为96.9%。在储存6个月后的重构之后,百分纯度为97.2%。因此,重构溶液的纯度在初始时间点与在40℃(75%相对湿度)下储存1个月、3个月和6个月后的重构之时和之后之间没有显著变化。

[0436] 40℃下长期储存后溶液的药物抗体比率没有变化

[0437] 对重构溶液进行疏水相互作用色谱 (HIC)。在初始时间点以及在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,所有重构溶液的DAR测量为4.2。

[0438] 40℃下长期储存后溶液中未偶联抗体百分比没有变化

[0439] 在初始时间点,该百分比不超过4.1。在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月后的重构之后,百分比不超过4.1。在40℃ (75%相对湿度) 下储存3个月后的重构之后,百分比不超过4.1。在40℃ (75%相对湿度) 下储存6个月后的重构之后,百分比不超过3.9。因此,所有时间点的百分比是相似的。

[0440] 40℃下长期储存没有改变溶液中淬灭的药物接头的百分比

[0441] 对重构溶液进行反相色谱 (RP-HPLC) 以测定淬灭的药物接头的百分比。在初始时间点,该百分比不超过0.007。在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在40℃ (75%相对湿度) 下储存3个月后的重构之后,百分比不超过0.006。在40℃ (75%相对湿度) 下储存6个月后的重构之后,百分比不超过0.005。因此,所有时间点的淬灭的药物接头的百分比是相似的。

[0442] 40℃下长期储存后溶液中的总杂质没有变化

[0443] 使用RP-HPLC分析重构溶液以测定总杂质的百分比。在初始时间点,百分比不超过0.007。在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月后的重构之后,百分比不超过0.005。在40℃ (75%相对湿度) 下储存3个月后的重构之后,百分比不超过0.006。在40℃ (75%相对湿度) 下储存6个月后的重构之后,百分比不超过0.005。因此,所有时间点的总杂质百分比是相似的。

[0444] 40℃下长期储存不影响溶液的颗粒污染

[0445] 通过测定显微颗粒评估颗粒污染。通过确定每个容器中超过10μm的颗粒数 (不超过6000) 满足可接受的标准 (USP (US药典) 和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过10μm的颗粒数是33。在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是5。在40℃ (75%相对湿度) 下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是12。在40℃ (75%相对湿度) 下储存6个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是32。因此,所有时间点每个容器中超过10μm的颗粒数满足可接受的标准。还通过测定每个容器中超过25μm的颗粒数 (不超过600) 满足可接受的标准。在初始时间点,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在40℃ (75%相对湿度) 下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在40℃ (75%相对湿度) 下储存6个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是2。因此,所有时间点每个容器中超过25μm的颗粒数满足可接受的标准。

[0446] 40℃下长期储存不影响溶液的水含量

[0447] 用Karl-Fischer滴定评估水含量。Karl-Fischer滴定使用电量或体积滴定来测定样品中痕迹的水,以百分比表示。在初始时间点,重构溶液中的水百分比为2.0%。在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比检测不到。在40℃ (75%相对湿度) 下储存3个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.9%。在40℃ (75%相对湿度) 下储存6个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为1.0%。因此,在初始时间点以及在储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,重构溶液中的水含量可忽略。

[0448] 40℃下长期储存不影响溶液的pH

[0449] 在初始时间点以及在40℃ (75%相对湿度) 下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后测定重构溶液的pH。在初始时间点, 重构溶液的pH值是6.0。在40℃ (75%相对湿度) 下储存3个月后的重构之后, 重构溶液的pH值是5.9。在40℃ (75%相对湿度) 下储存6个月后的重构之后, 重构溶液的pH值是5.9。

[0450] 根据本文所述的以及其内容通过引用在此并入本文的申请日为2014年3月14的美国临时申请号61/792834和美国申请号14/210,602公开的批纯化方法进行ADC1-MMAF的纯化。实施例6-8所述的包含ADC1-MMAFp的ADC混合物的平均DAR为约3.0。

[0451] 实施例6-8所述的稳定性实验在初始时间点用SWFI重构之后以及在将包含ADC1-MMAFp的冻干物在5℃下储存3个月、在25℃ (60%相对湿度) 下和40℃ / (75%相对湿度) 下储存1个月和3个月后的重构之后进行。

[0452] 实施例6: 冻干制剂中纯化的ADC1-MMAF (ADC1-MMAFp) 在5℃下的稳定性

[0453] 在初始时间点用SWFI重构实施例2所述的冻干ADC1-MMAFp制剂之后以及在将冻干物于5℃下储存长达3个月后制剂重构之后进行以下测试。

[0454] 5℃下长期储存不影响冻干物和重构溶液的外观

[0455] 视觉评估冻干物和重构溶液的外观以确认冻干物实际上不含肉眼可见的外来颗粒物质, 且在包装材料中不含水分。在初始时间点以及在5℃下储存3个月后的重构之后, 冻干物的外观符合上述标准。重构后, 重构溶液是无色至微黄色的溶液, 且实际上不含肉眼可见的颗粒物质。

[0456] 5℃下长期储存不影响溶液颜色

[0457] 用蓝/黄标尺 (BY标尺) 评估重构溶液的颜色 (目视), 其中将样品相对于参考溶液测试并报告值。在初始时间点以及在5℃下储存3个月后的重构之后, 所有重构溶液的BY标尺测量值小于或等于7。因此, ADC1-MMAFp制剂的储存不影响溶液颜色。

[0458] 5℃下长期储存不影响溶液的澄清度和乳浊度

[0459] 评估重构溶液的澄清度和乳浊度。在初始时间点以及在5℃下储存3个月后的重构之后, 重构溶液的外观没有高于参考悬浮液IV (按照欧洲药典, ph.Eur) 的乳浊度 ( $\leq$  RSII)。

[0460] 5℃下长期储存不影响溶液的生物活性

[0461] 采用人表皮样癌细胞系的细胞毒性试验用于测试重构溶液相对于之前已经确认为具有细胞毒性活性的ADC1-MMAF对照 (对照具有100%的活性) 的生物活性 (%)。在初始时间点, 相对生物活性为102%。在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后, 相对生物活性为98%。

[0462] 5℃下长期储存不影响分子和/或分子复合物的尺寸

[0463] 使用尺寸排阻-高效液相色谱法 (SE-HPLC) 进行重构溶液的尺寸排阻色谱。除了高分子量种类 (%) 和低分子量种类 (%) 外, 还测量主峰 (%)。在初始时间点, 主峰是99.5%。高分子量种类是0.2%, 和低分子量种类是0.2%。在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后, 主峰是99.6%。在初始时以及在以冻干形式储存3个月后的重构时, 高分子量种类是0.2%, 和低分子量种类是0.2%。

[0464] 因此, 在初始和3个月时间点的测量中, 所有时间点的主峰%以及高分子量和低分子量种类的变化非常小或没有变化。

[0465] 5℃下长期储存不改变溶液的色谱峰

[0466] 使用高效液相色谱法 (CEX-HPLC) 对重构溶液进行阳离子交换色谱 (CEX)。在阳离子交换色谱中,带正电荷的分子被吸引到带负电荷的固体支持物。在初始时间点以及在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后,通过与对照 (其为之前表征过的ADC1-MMAF) 相符的样品主要色谱峰模式来表征重构溶液的外观。因此,在5℃下3个月的过程中,色谱峰保持相对不变。

[0467] 5℃下长期储存不影响溶液的纯度

[0468] 在初始时间点以及在5℃下储存3个月后的重构之后,对重构溶液进行毛细管凝胶电泳 (CE-SDS-R) 来测定溶液纯度。在初始时间点,纯度百分比为97.4%。在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后,纯度百分比为97.6%。因此,重构溶液的纯度在初始时间点以及3个月储存之间没有显著变化。

[0469] 5℃下储存后ADC1-MMAF的药物-抗体比率 (DAR) 保持不变

[0470] 对重构溶液进行疏水相互作用色谱 (HIC) 分析以测定在3个月储存期间的药物-抗体比率 (DAR)。HIC基于相对疏水性用来分离蛋白。在初始时间点以及在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后,ADC1-MMAF的平均药物-抗体比 (DAR) 分别测定为3.0和2.9。

[0471] 5℃下储存后溶液的未偶联抗体1的百分比没有变化

[0472] 还分析重构溶液以测定ADC1-MMAF的未偶联抗体百分比。在初始时间点,百分比不超过7.6。在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后,百分比不超过7.6。因此,在3个月期间未偶联抗体1的百分比保持相同。

[0473] 5℃下储存没有改变溶液中淬灭的药物接头的百分比

[0474] 对重构溶液进行反相色谱 (RP-HPLC) 以测定淬灭的药物接头的百分比。在初始时以及在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后均没有检测到淬灭的药物接头的百分比 (实际检测极限为0.001%)。

[0475] 5℃下储存后溶液中的总杂质没有变化

[0476] 还使用RP-HPLC分析重构溶液以测定总杂质百分比。在初始时以及在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后均没有检测到总杂质的百分比 (实际检测极限为0.001%;实际定量极限为0.003%)。

[0477] 5℃下储存不影响溶液的颗粒污染

[0478] 使用两种不同的可接受标准通过测定显微颗粒评估颗粒污染。

[0479] 通过确定每个容器中超过10μm的颗粒数 (不超过6000) 满足可接受的标准 (USP (US药典) 和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过10μm的颗粒数是13。在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是20。因此,两个时间点每个容器中超过10μm的颗粒数均满足可接受的标准。

[0480] 还通过测定每个容器中超过25μm的颗粒数 (NMT 600) 满足可接受的标准 (USP (US药典) 和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在5℃下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。因此,两个时间点每个容器中超过25μm的颗粒数均满足可接受的标准。

[0481] 5℃下储存不影响溶液的水含量

[0482] 用Karl-Fischer滴定评估水含量。Karl-Fischer滴定使用电量或体积滴定来测定

样品中痕量的水,以百分比表示。在初始时间点,重构溶液中的水百分比为0.8%。在5℃下以冻干形式储存3个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.8%。因此,在初始时间点以及在5℃下储存3个月后的重构之后,重构溶液中的水含量可忽略。

[0483] 5℃下储存不影响溶液的pH

[0484] 在初始时间点以及在5℃下储存3个月后的重构之后测定重构溶液的pH。在初始时间点,重构溶液的pH值是5.9。在5℃下储存3个月之后,重构溶液的pH值是5.9。因此,在5℃下ADC1-MMAFp组合物储存3个月不影响pH。

[0485] 实施例7:冻干制剂中ADC1-MMAFp在25℃下的稳定性

[0486] 在初始时间点用SWFI重构冻干的ADC1-MMAFp制剂(参见实施例2)之后以及在将冻干物于25℃(60%相对湿度)下储存1个月和3个月后的重构之后进行以下试验。

[0487] 25℃下储存不影响冻干物和重构溶液的外观

[0488] 视觉评估冻干物和重构溶液的外观以确认冻干物实际上不含肉眼可见的外来颗粒物质,且在包装材料中不含水分。在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后,冻干物的外观符合上述标准。重构后,重构溶液是无色至微黄色的溶液,实际上不含肉眼可见的颗粒物质。因此,在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后,重构溶液的外观是无色至微黄色的溶液,且实际上不含肉眼可见的颗粒物质。

[0489] 25℃下储存不影响溶液颜色

[0490] 用蓝/黄(BY)标尺评估溶液的颜色(目视),其中将样品相对于参考溶液测试并报告值。在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后,所有重构溶液的BY标尺测量值小于或等于7。因此,储存不影响溶液颜色。

[0491] 25℃下储存不影响溶液的澄清度和乳浊度

[0492] 评估重构溶液的澄清度和乳浊度。如果重构溶液的乳浊度不高于参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur),则满足重构溶液的可接受标准。在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后,重构溶液的外观没有高于参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur)的乳浊度( $\leq$ RSII)。

[0493] 25℃下储存不影响溶液的生物活性

[0494] 采用人表皮样癌细胞系的细胞毒性试验用于测试重构溶液相对于之前已经确认为具有细胞毒性活性的ADC1-MMAF对照(对照具有100%的活性)的生物活性(%)。在初始时间点,相对生物活性为102%。在25℃下储存1个月后的重构之后,相对生物活性为101%。在25℃下储存3个月后的重构之后,相对生物活性为97%。

[0495] 25℃下储存不影响分子和/或分子复合物的尺寸

[0496] 使用尺寸排阻-高效液相色谱法(SE-HPLC)进行尺寸排阻色谱。除了高分子量种类(%)和低分子量种类(%)外,还测量主峰(%)。在初始时间点,主峰是99.5%。高分子量种类是0.2%,和低分子量种类是0.2%。在25℃下储存1个月后的重构之后,主峰是99.5%。高分子量种类是0.3%,和低分子量种类是0.2%。在25℃下储存3个月后的重构之后,主峰是99.6%。高分子量种类是0.3%,和低分子量种类是0.2%。因此,在初始、1个月和3个月的测量中,主峰%以及高分子量和低分子量种类的变化非常小或没有变化。

[0497] 25℃下储存不改变溶液的色谱峰

[0498] 使用高效液相色谱法(CEX-HPLC)进行阳离子交换色谱(CEX)。在初始时间点以及

在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后,通过与对照标准相符的样品的主要色谱峰模式来表征重构溶液的外观。

[0499] 25℃下储存不影响溶液的纯度

[0500] 在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后,对重构溶液进行毛细管凝胶电泳(CE-SDS-R)。在初始时间点,纯度百分比为97.4%。在储存1个月后的重构之后,纯度百分比为97.5%。在储存3个月后的重构之后,纯度百分比为97.6%。因此,重构溶液的纯度在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后之间没有显著变化。

[0501] 25℃下储存后溶液中ADC1-MMAFP的药物-抗体比率(DAR)保持不变

[0502] 对重构溶液进行疏水相互作用色谱(HIC)。在初始时间点,测量的DAR为3.0。在25℃下储存1个月后的重构之后,测量的DAR为3.0。在25℃下储存3个月后的重构之后,测量的DAR为2.9。因此,在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后之间的ADC1-MMAFP的DAR没有显著变化。

[0503] 25℃下储存后溶液的未偶联抗体1的百分比没有变化

[0504] 分析重构溶液以测定未偶联抗体1的百分比。在初始时间点,百分比不超过7.6。在25℃下储存1个月后的重构之后,百分比不超过7.6。在25℃下储存3个月后的重构之后,百分比不超过7.6。

[0505] 25℃下储存没有改变溶液中淬灭的药物接头的百分比

[0506] 对重构溶液进行反相色谱(RP-HPLC)以测定淬灭的药物接头的百分比。在初始时间点、1个月的时间点和3个月的时间点,淬灭的接头的百分比是不可检测的(实际检测极限为0.001%;实际定量极限为0.003%)。

[0507] 25℃下储存后溶液中的总杂质没有变化

[0508] 分析重构溶液以测定总杂质百分比。在初始时间点,没有检测到百分比。在25℃下储存1个月后的重构之后,杂质百分比少于0.003。在25℃下储存3个月后的重构之后,没有检测到百分比(实际检测极限为0.001%;实际定量极限为0.003%)。因此,所有时间点的总杂质百分比是相似的。

[0509] 25℃下储存不影响溶液中的颗粒污染

[0510] 根据两种可接受标准通过测定显微颗粒评估颗粒污染。

[0511] 通过测定每个容器中超过10μm的颗粒数(不超过6000)满足可接受的标准(USP(US药典)和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过10μm的颗粒数是13。在25℃下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是12。在25℃下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是17。因此,所有时间点每个容器中超过10μm的颗粒数满足可接受的标准。

[0512] 还通过测定每个容器中超过25μm的颗粒数(不超过600)满足可接受的标准。在初始时间点,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在25℃下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在25℃下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是7。因此,所有时间点每个容器中超过25μm的颗粒数满足可接受的标准。

[0513] 25℃下储存不影响溶液的水含量

[0514] 用Karl-Fischer滴定评估水含量。在初始时间点,重构溶液中的水百分比为0.8%。在25℃下储存1个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.8%。在25℃下储存3

个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.8%。因此,在初始时间点以及在储存1个月和3个月后的重构之后,重构溶液的水含量可忽略。

[0515] 25℃下储存不影响溶液的pH

[0516] 在初始时间点以及在25℃下储存1个月和3个月后的重构之后测定重构溶液的pH。在初始时间点,重构溶液的pH值是6.0。在25℃下储存3个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。在25℃下储存6个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。

[0517] 实施例8:ADC1-MMAFp冻干制剂在40℃下的稳定性

[0518] 在初始时间点用SWFI重构实施例2所述的冻干ADC1-MMAFp制剂之后以及在将冻干物于40℃/(75%相对湿度)下储存1个月和3个月后的重构之后进行以下测试。

[0519] 40℃下储存不影响冻干物和重构溶液的外观

[0520] 视觉评估冻干物和重构溶液的外观以确认冻干物实际上不含肉眼可见的外来颗粒物质,且在包装材料中不含水分。在初始时间点以及在40℃下储存1个月和3个月后的重构之后,冻干物的外观符合上述标准。重构后,重构溶液是无色至微黄色的溶液,实际上不含肉眼可见的颗粒物质。在初始时间点以及在40℃下储存1个月和3个月后的重构之后,重构溶液的外观是无色至微黄色的溶液,实际上不含肉眼可见的颗粒物质。

[0521] 40℃下储存不影响溶液颜色

[0522] 用BY标尺评估重构溶液的颜色(目视),其中将样品相对于参考溶液测试并报告值。在初始时间点以及在40℃下储存1个月和3个月后的重构之后,所有重构溶液的BY标尺测量值小于或等于7。因此,储存不影响溶液颜色。

[0523] 40℃下储存不影响溶液的澄清度和乳浊度

[0524] 评估重构溶液的澄清度和乳浊度。如果重构溶液的乳浊度不高于参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur),则满足重构溶液的可接受标准。在初始时间点以及在40℃下储存1个月和3个月后的重构之后,重构溶液的外观没有高于参考悬浮液IV(按照欧洲药典,ph.Eur)的乳浊度( $\leq$ RSII)。

[0525] 40℃下储存不影响溶液的生物活性

[0526] 采用人表皮样癌细胞系的细胞毒性试验用于测试重构溶液相对于之前已经确认为具有细胞毒性活性的ADC1-MMAF对照(对照具有100%的活性)的生物活性(%)。在初始时间点,生物活性为102%。在40℃下储存1个月后的重构之后,相对生物活性为101%。在40℃下储存3个月后的重构之后,相对生物活性为105%。因此,在实施例2的制剂中,所有时间点的生物活性百分比具有超过100%的生物活性。

[0527] 40℃下储存不影响分子和分子复合物的尺寸

[0528] 使用尺寸排阻-高效液相色谱法(SE-HPLC)进行尺寸排阻色谱。除了高分子量种类(%)和低分子量种类(%),还测量主峰(%)。在初始时间点,主峰是99.5%。高分子量种类是0.2%,和低分子量种类是0.2%。在40℃下储存1个月后的重构之后,主峰是99.5%。高分子量种类是0.3%,和低分子量种类是0.2%。在40℃下储存3个月后的重构之后,主峰是99.5%。高分子量种类是0.3%,和低分子量种类是0.2%。因此,在初始、1个月和3个月的测量中,主峰%以及高分子量和低分子量种类的变化非常小或没有变化。

[0529] 40℃下储存不改变溶液的色谱峰

[0530] 使用高效液相色谱法(CEX-HPLC)进行阳离子交换色谱(CEX)。在初始时间点以及

在40℃下储存1个月和3个月后的重构之后,通过与对照标准相符的样品主要色谱峰模式来表征重构溶液的外观。

[0531] 40℃下储存不影响溶液的纯度

[0532] 在初始时间点以及在40℃下储存1个月、3个月和6个月后的重构之后,对重构溶液进行毛细管凝胶电泳(CE-SDS-R)并用于测定溶液的纯度百分比。在初始时间点,纯度百分比为97.4%。在储存1个月后的重构之后,纯度百分比为97.5%。在储存3个月后的重构之后,纯度百分比为97.6%。因此,重构溶液的纯度在初始时间点与在40℃下储存1个月和3个月后的重构时和之后之间没有显著变化。

[0533] 40℃下储存后ADC1-MMAFP的药物-抗体比率(DAR)没有变化

[0534] 对重构溶液进行疏水相互作用色谱(HIC)。在初始时间点,测量的DAR为3.0。在40℃下储存1个月后的重构之后,测量的DAR为3.0。在40℃下储存3个月后的重构之后,测量的DAR为2.9。因此,在初始时间点以及在40℃下储存1个月和3个月后的重构之后的DAR没有显著变化。

[0535] 40℃下储存后溶液的未偶联抗体1的百分比没有变化

[0536] 在初始时间点,未偶联抗体1的百分比不超过7.6。在40℃下储存1个月后的重构之后,未偶联抗体1的百分比不超过7.6。在40℃下储存3个月后的重构之后,未偶联抗体1的百分比不超过7.6。因此,所有时间点的百分比是相似的。

[0537] 40℃下储存没有改变溶液中淬灭药物接头的百分比

[0538] 对重构溶液进行反相色谱(RP-HPLC)以测定淬灭的药物接头的百分比。在初始时间点,没有检测到百分比。在40℃下储存1个月后的重构之后,没有检测到百分比。在40℃下储存3个月后的重构之后,没有检测到百分比。因此,所有时间点的淬灭的药物接头的百分比均没有检测到。

[0539] 40℃下储存后溶液中的总杂质没有变化

[0540] 使用RP-HPLC分析重构溶液以测定总杂质百分比。在初始时间点,没有检测到百分比。在40℃下储存1个月后的重构之后,百分比小于0.003。在40℃下储存3个月后的重构之后,没有检测到百分比。因此,所有时间点的总杂质百分比是相似的。

[0541] 40℃下储存不影响溶液的颗粒污染

[0542] 根据两种可接受标准通过测定显微颗粒评估颗粒污染。

[0543] 通过测定每个容器中超过10μm的颗粒数(不超过6000)满足可接受的标准(USP(US药典)和欧洲药典标准)。在初始时间点,每个容器中超过10μm的颗粒数是13。在40℃下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是5。在40℃下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过10μm的颗粒数是8。因此,所有时间点每个容器中超过10μm的颗粒数满足可接受标准。

[0544] 还通过测定每个容器中超过25μm的颗粒数(不超过600)满足可接受的标准。在初始时间点,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在40℃下储存1个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是0。在40℃下储存3个月后的重构之后,每个容器中超过25μm的颗粒数是2。因此,所有时间点每个容器中超过25μm的颗粒数满足可接受的标准。

[0545] 40℃下储存不影响溶液的水含量

[0546] 用Karl-Fischer滴定评估水含量。Karl-Fischer滴定使用电量或体积滴定来测定

样品中痕量的水,以百分比表示。在初始时间点,重构溶液中的水百分比为0.8%。在40℃下储存1个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.8%。在40℃下储存3个月后的重构之后,重构溶液中的水百分比为0.8%。因此,在初始时间点以及在储存1个月和3个月后的重构之后,重构溶液中的水含量可忽略。

[0547] 40℃下储存不影响溶液的pH

[0548] 在初始时间点以及在40℃下储存1个月和3个月后的重构之后测定重构溶液的pH。在初始时间点,重构溶液的pH值是5.9。在40℃下储存3个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。在40℃下储存6个月后的重构之后,重构溶液的pH值是5.9。

[0549] 实施例9:冻干ADC1-MMAF制剂的大规模制备

[0550] 对于本体溶液的制备,将组氨酸溶于注射用水中,用10%w/w的盐酸调节pH,并添加注射用水至最终重量。称重制剂缓冲赋形剂(蔗糖和聚山梨醇酯80),并溶于15mM组氨酸溶液中。然后检查所得溶液的外观。

[0551] 在30℃的水浴中解冻ADC1-MMAF,检查外观,汇合并称重。向ADC1-MMAF添加15mM组氨酸缓冲液、聚山梨醇酯80和蔗糖。检查溶液的外观,并测定它的pH和密度,然后无菌过滤。然后在控制条件下冻干所述溶液。

[0552] 下表2列出了在制备用于注射液(20mg/mL)的ADC1-MMAF粉末的过程中进行的关键在线测试。

[0553] 表2. 在线控制测试和接受限度

[0554]

操作	测试	接受限度
第一次过滤	过滤器完整性	正向流测试、扩散速率或起泡点必须符合过滤器规格
通过过滤除菌	在第二次过滤之前的生物负载 过滤器完整性	< 10 CFU/100 mL  正向流测试、扩散速率或起泡点必须符合过滤器规格

[0555] 下表3示出了用于冻干的典型批次的ADC1-MMAF溶液所用的ADC1-MMAF和缓冲液的量。表4和表5描述了用于制备制剂缓冲液的成分及其量的列表。

[0556] 表3. ADC1-MMAF本体药品溶液的批次配方

[0557]

剂量强度	20mg/mL
批大小	27L <sup>a</sup>
成分	量(kg)/批
ADC 1-MMAF药物物质	15.57 <sup>b, c, d</sup>
制剂缓冲液 <sup>e</sup>	12.29 <sup>d</sup>

[0558] a. 本体溶液密度:1.032g/mL

[0559] b. 相当于35g蛋白质/L药物物质浓缩物的0.540kg蛋白质;药物物质浓缩物的密度:1.0089g/mL

- [0560] c. 药物物质浓缩物包含15mM组氨酸  
 [0561] d. 量随药物物质浓缩物的实际蛋白质浓度变化  
 [0562] e. 这一材料的批次配方示于表4中。  
 [0563] 表4. 制剂缓冲液的批次配方

[0564]

批大小	11.58L <sup>a</sup>
成分 <sup>b</sup>	量(g)/批次
蔗糖	1890 <sup>b</sup>
聚山梨醇酯80	2.7 <sup>c</sup>
15mM组氨酸溶液 <sup>d</sup>	ad 12290

- [0565] 缩写: ad=至总重量  
 [0566] 溶液密度: 1.0616g/mL  
 [0567] 量相当于70g/L的本体产品溶液的最终浓度  
 [0568] 含量相当于0.10g/L的本体产品溶液的最终浓度  
 [0569] 这一材料的批次配方示于表5中。  
 [0570] 表5. 15mM组氨酸溶液的批次配方

[0571]

批大小	15L <sup>a</sup>
成分	量(g)/批次
组氨酸	34.95
盐酸10% (w/w) <sup>b</sup>	q.s
注射用水	ad 14999

- [0572] 缩写: ad=至总重量  
 [0573] 溶液密度: 0.9993g/mL  
 [0574] 用于调节pH。  
 [0575] 应当理解, 在此所述的实施例和实施方案仅用于说明性目的, 且基于此的各种修改或变化将是本领域技术人员可以想到的, 并包含于所附权利要求的精神和范围内。出于所有目的, 在此引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用其全文并入本文。

[0576] 序列总述

[0577]

SEQ ID NO: 1	核酸	抗体 2(鼠抗 EGFR Ab)的可变重链序列
SEQ ID NO: 2	蛋白质	抗体 2(鼠抗 EGFR Ab)的可变重链序列
SEQ ID NO: 3	核酸	抗体 2(鼠抗 EGFR Ab)的可变轻链序列
SEQ ID NO: 4	蛋白质	抗体 2(鼠抗 EGFR Ab)的可变轻链序列

[0578]

SEQ ID NO: 5	蛋白质	可变重链序列 SEQ ID NO: 2 的 CDR1
SEQ ID NO: 6	蛋白质	可变重链序列 SEQ ID NO: 2 的 CDR2
SEQ ID NO: 7	蛋白质	可变重链序列 SEQ ID NO: 2 的 CDR3
SEQ ID NO: 8	蛋白质	可变轻链序列 SEQ ID NO: 2 的 CDR1
SEQ ID NO: 9	蛋白质	可变轻链序列 SEQ ID NO: 2 的 CDR2
SEQ ID NO: 10	蛋白质	可变轻链序列 SEQ ID NO: 2 的 CDR3
SEQ ID NO: 11	蛋白质	不含信号肽的抗体 2(鼠抗 EGFR Ab)的可变重链序列
SEQ ID NO: 12	蛋白质	不含信号肽的抗体 2(鼠抗 EGFR Ab)的可变轻链序列
SEQ ID NO: 13	蛋白质	抗体 1(人源化抗 EGFR Ab)的可变重链序列
SEQ ID NO: 14	蛋白质	抗体 1(人源化抗 EGFR Ab)的恒定重链序列
SEQ ID NO: 15	蛋白质	可变重链序列 SEQ ID NO: 13 的 CDR1
SEQ ID NO: 16	蛋白质	可变重链序列 SEQ ID NO: 13 的 CDR2
SEQ ID NO: 17	蛋白质	可变重链序列 SEQ ID NO: 13 的 CDR3
SEQ ID NO: 18	蛋白质	抗体 1(人源化抗 EGFR Ab)的可变轻链序列
SEQ ID NO: 19	蛋白质	抗体 1(人源化抗 EGFR Ab)的恒定轻链序列
SEQ ID NO: 20	蛋白质	可变轻链序列 SEQ ID NO: 18 的 CDR1
SEQ ID NO: 21	蛋白质	可变轻链序列 SEQ ID NO: 18 的 CDR2
SEQ ID NO: 22	蛋白质	可变轻链序列 SEQ ID NO: 18 的 CDR3

## 序列表

<110> ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG 和 ABBVIE INC.

<120> 抗 EGFR 抗体药物偶联物制剂

<130> 117813-06020

<140> 新申请

<141> 同时附上

<150> 61/790,490

<151> 2013-03-15

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 402

<212> DNA

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 1

atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctggtgtcct gtctgatgtg 60

cagcttcagg agtcgggacc tagcctgggtg aaaccttctc agtctctgtc cctcacctgc 120

actgtcactg gctactcaat caccagtgat ttgcctgga actggatccg gcagtttcca 180

ggaacaagc tggagtggat gggctacata agttatagt gtaacactag gtacaacca 240

tctctcaaaa gtcgaatctc tatcactcga gacacatcca agaaccaatt cttcctgcag 300

ttgaattctg tgactattga ggacacagcc acatattact gtgtaacggc gggacgcggg 360

tttccttatt ggggccaagg gactctgggtc actgtctctg ca 402

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 2

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val  
1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro  
20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
35 40 45

Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu  
50 55 60

[0002]

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
85 90 95

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ala  
130

<210> 3

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成多核苷酸

&lt;400&gt; 3

atgggtgtcca cagctcagtt ccttgcatte ttgttgcttt ggtttccagg tgcaagatgt 60

gacatcctga tgaccaate tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120

atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca 180

gggaaatcat ttaagggeet gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 240

aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 300

gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcgggtgga 360

[0003]

ggcaccaagc tggaaatcaa acgt 384

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成多肽

&lt;400&gt; 4

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser

20 25 30

Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp

35 40 45

Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe  
50 55 60

Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser  
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala  
100 105 110

Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

[0004]

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成肽

&lt;400&gt; 5

Ser Asp Phe Ala Trp Asn

1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成肽

&lt;400&gt; 6

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 7

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr

1

5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

[0005]

<400> 8

His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly

1

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 9

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 10

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr  
1 5

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 11

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

[0006]

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

	100	105	110
	Thr Val Ser Ala		
	115		
	<210> 12		
	<211> 108		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列的描述：合成多肽		
	<400> 12		
	Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly		
	1 5 10 15		
[0007]	Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn		
	20 25 30		
	Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile		
	35 40 45		
	Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser		
	65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp		
	85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	100 105		

<210> 13  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 13  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1                  5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp  
                  20                  25                  30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                  35                  40                  45

[0008] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu  
                  50                  55                  60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
65                  70                  75                  80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                  85                  90                  95

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                  100                  105                  110

Thr Val Ser Ser  
                  115

<210> 14  
<211> 330  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

[0009]

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
						165				170					175		
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180				185					190				
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
			195				200					205					
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
		210					215					220					
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
	225					230					235				240		
[0010]	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245						250				255			
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260						265					270			
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275						280					285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
		290					295					300					
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
	305					310					315				320		
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				325						330							

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 15

Ser Asp Phe Ala Trp Asn

1 5

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

[0011]

<400> 16

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 17

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr  
1 5

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn  
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile  
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

[0012]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 19

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1	5	10	15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
20	25	30	
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
35	40	45	
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
50	55	60	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
65	70	75	80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
85	90	95	

[0013]

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成肽

&lt;400&gt; 20

His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
1 5 10

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 21

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

[0014]

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 22

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

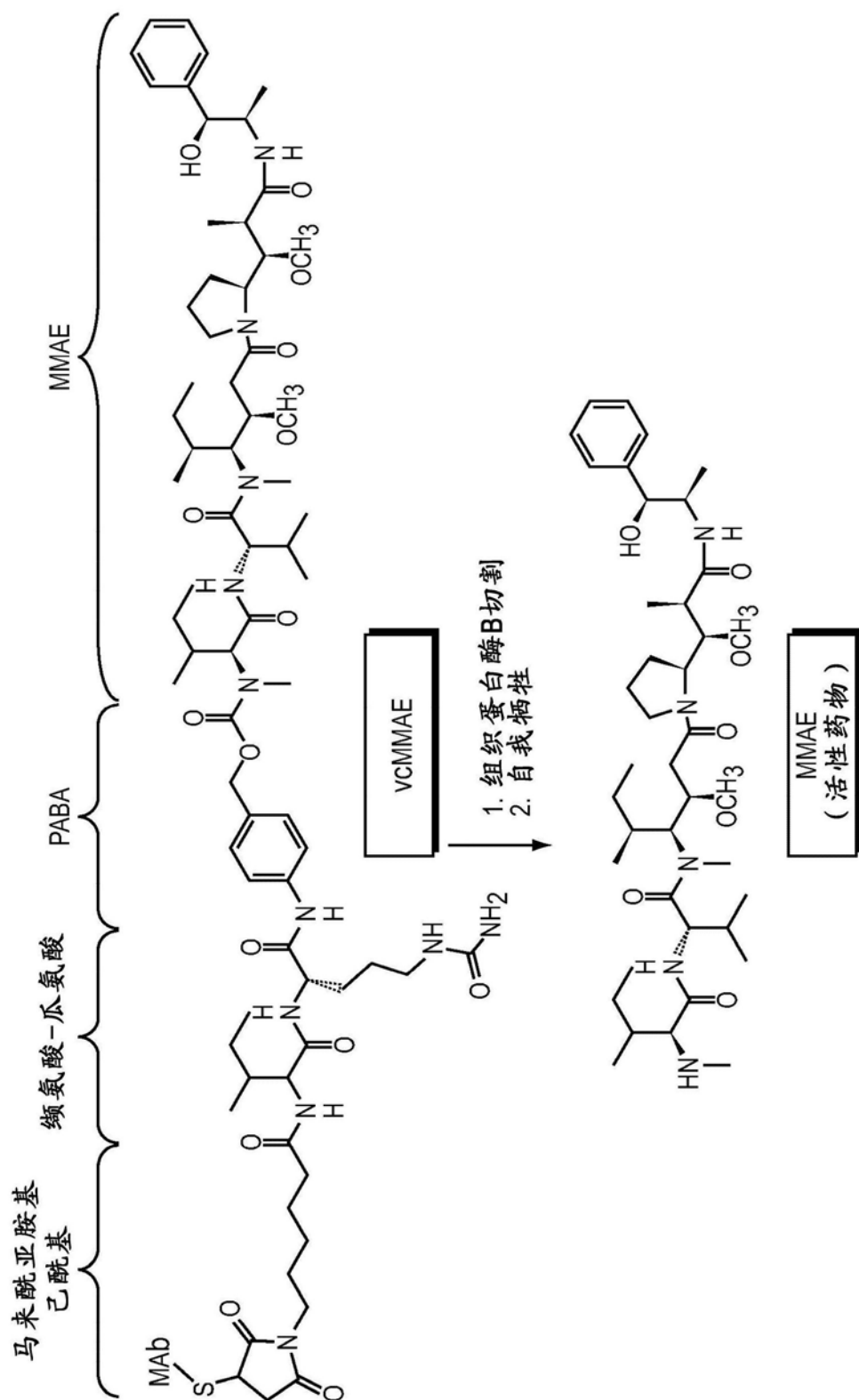


图1

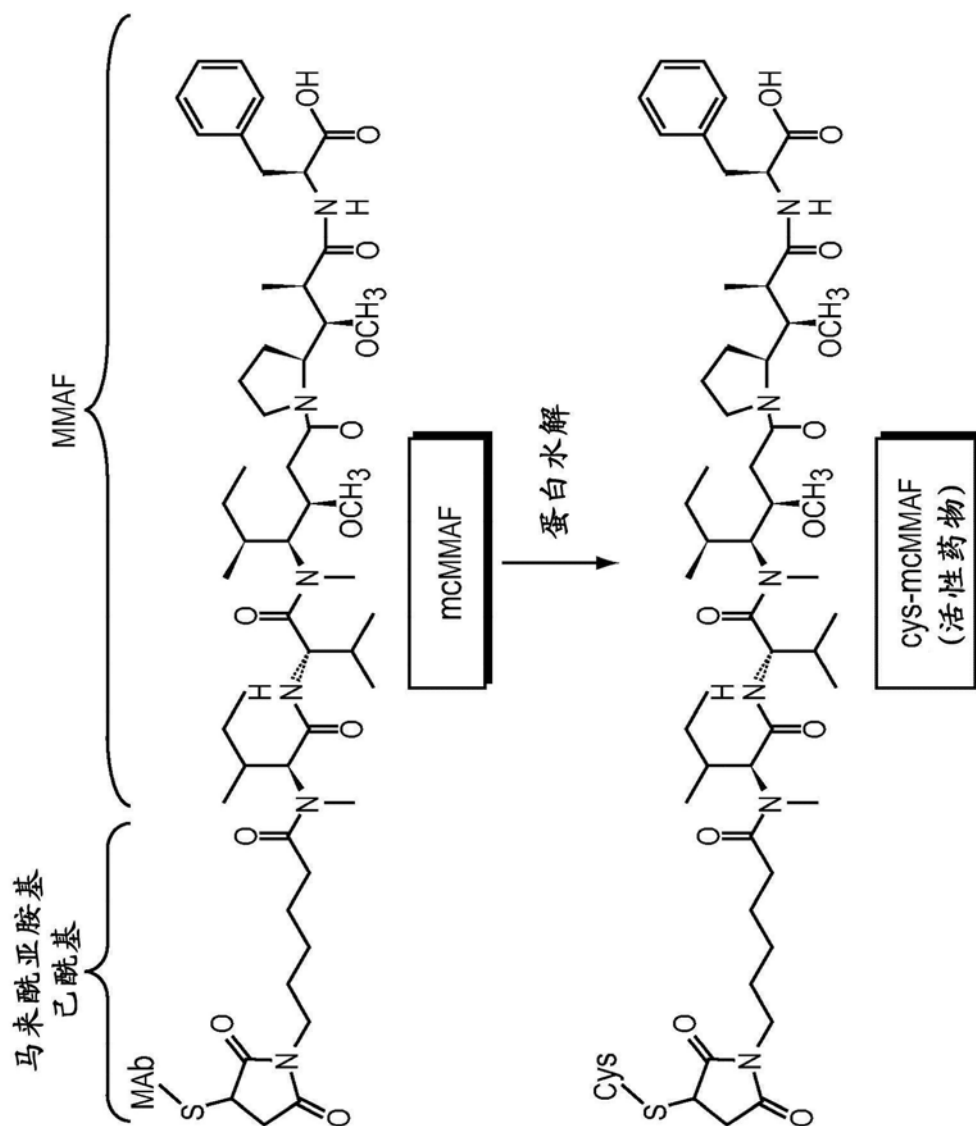


图2

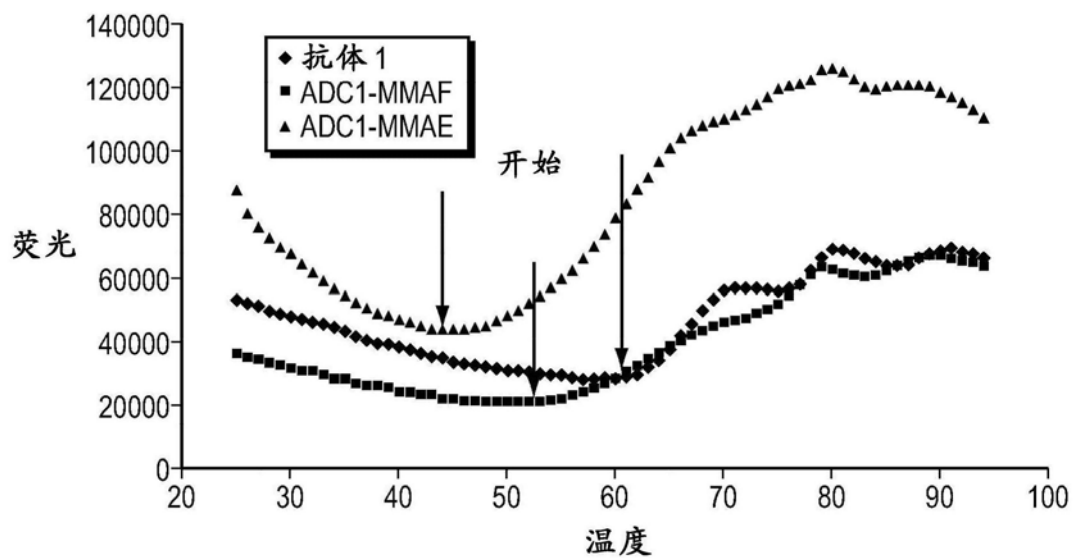


图3A

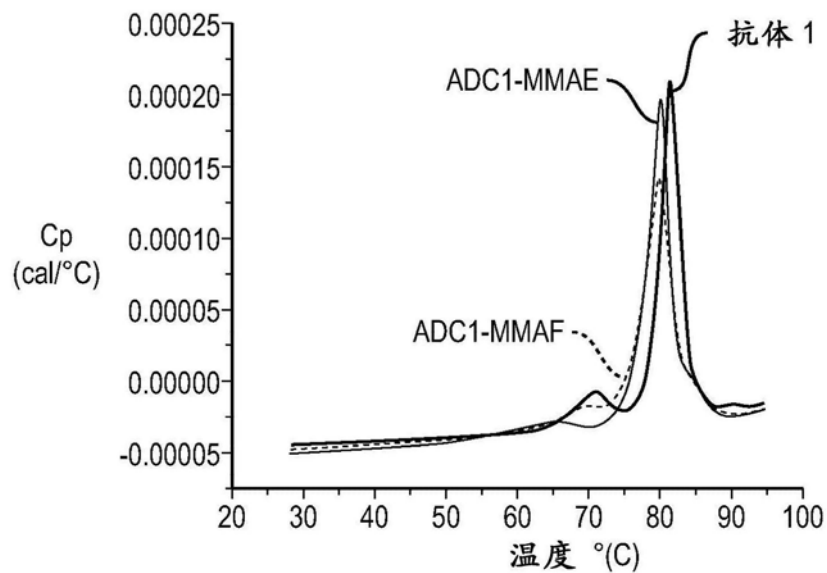


图3B

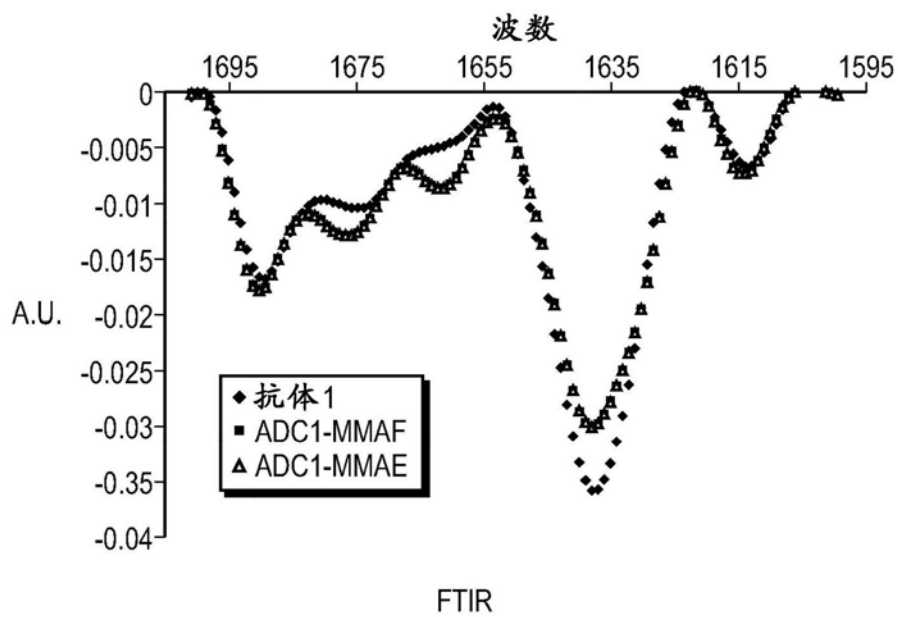


图4A

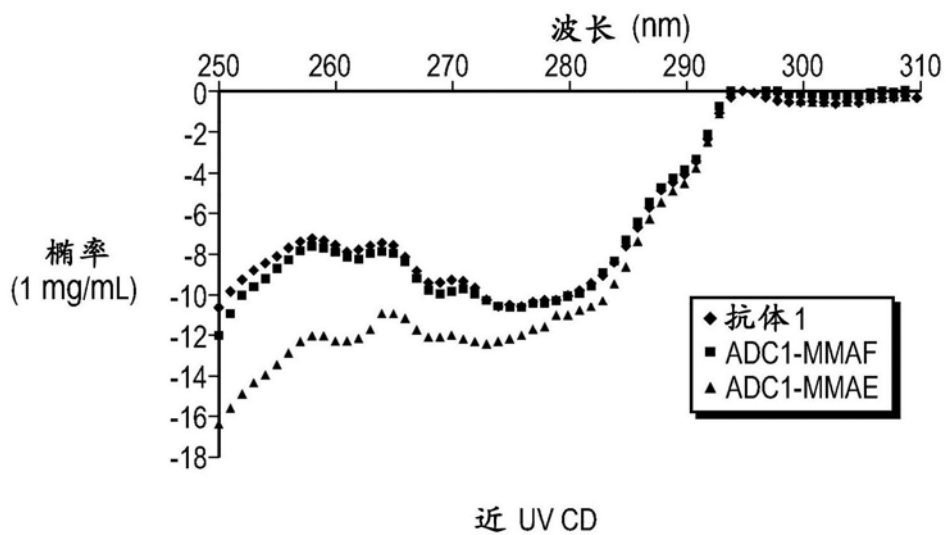


图4B

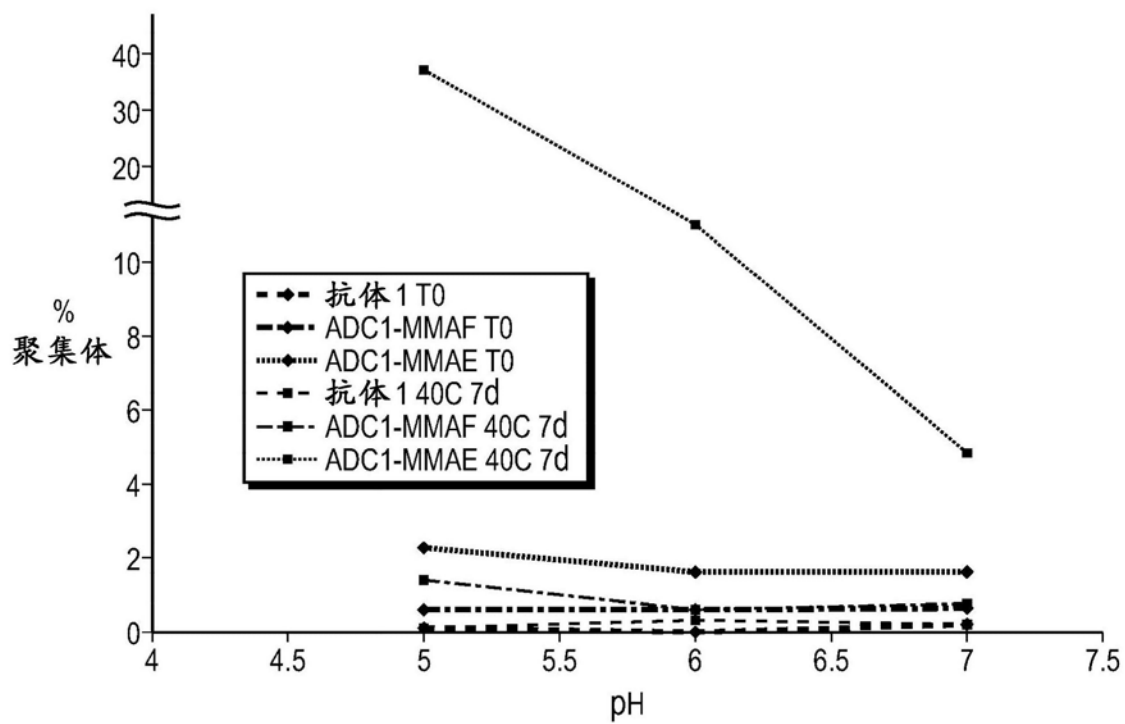


图5

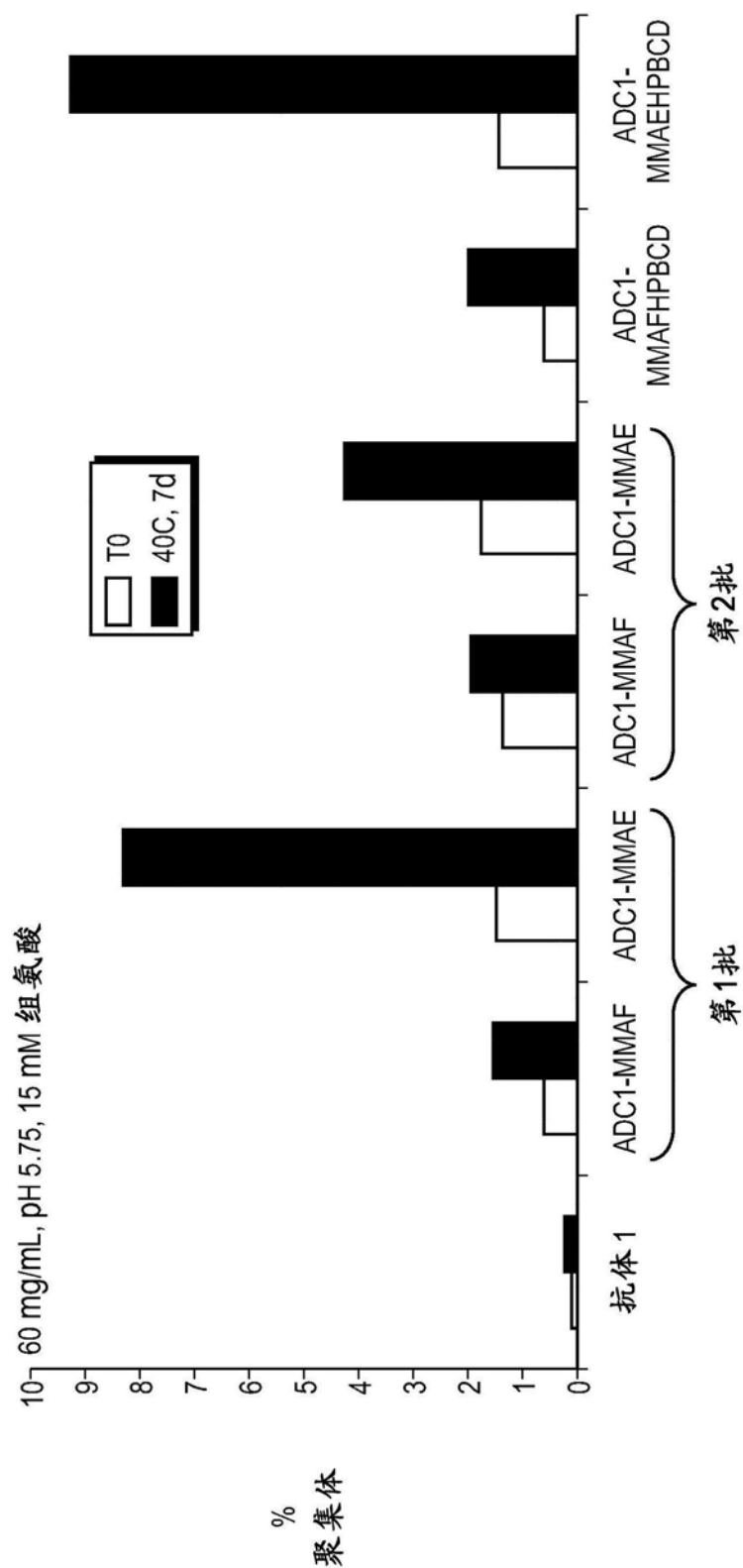


图6

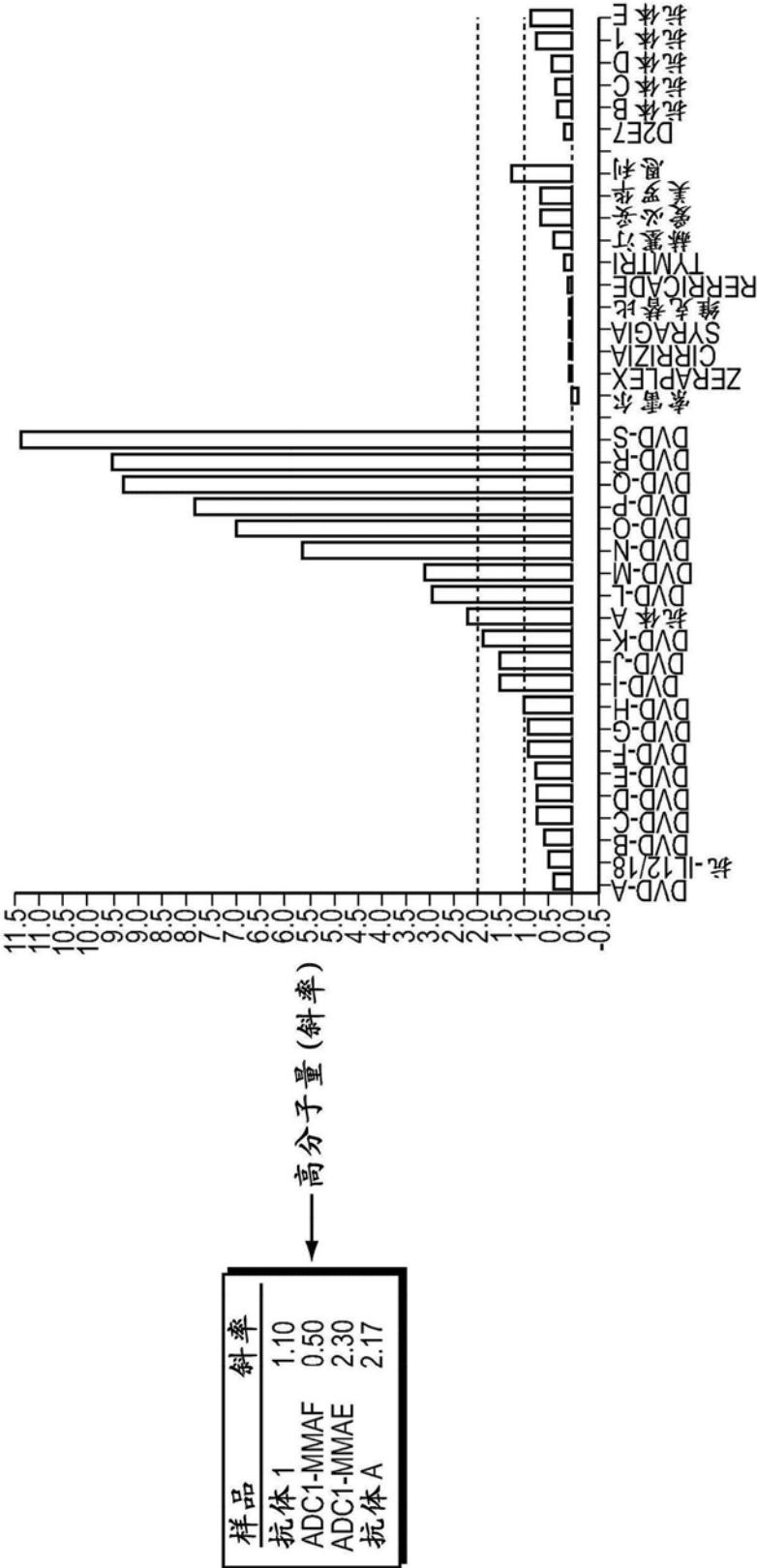


图7

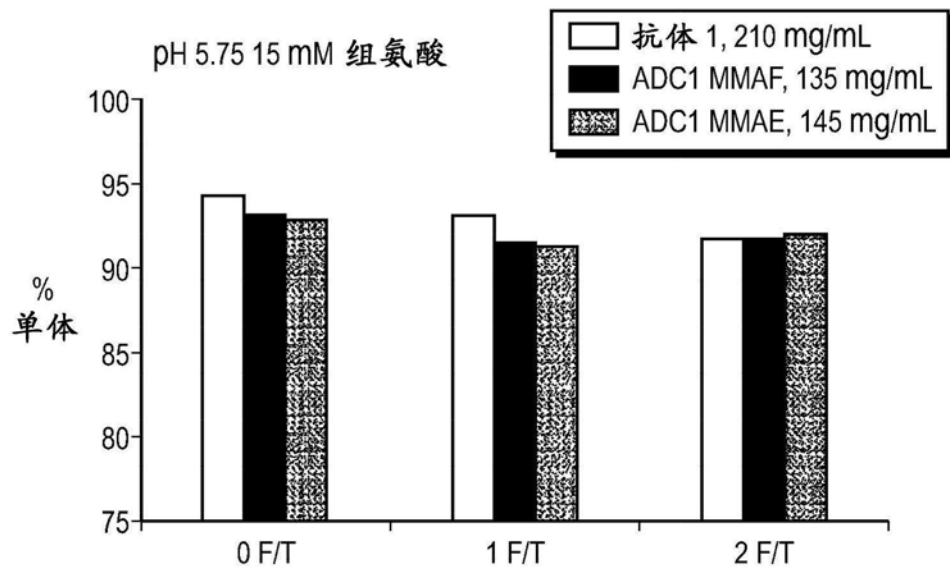


图8A

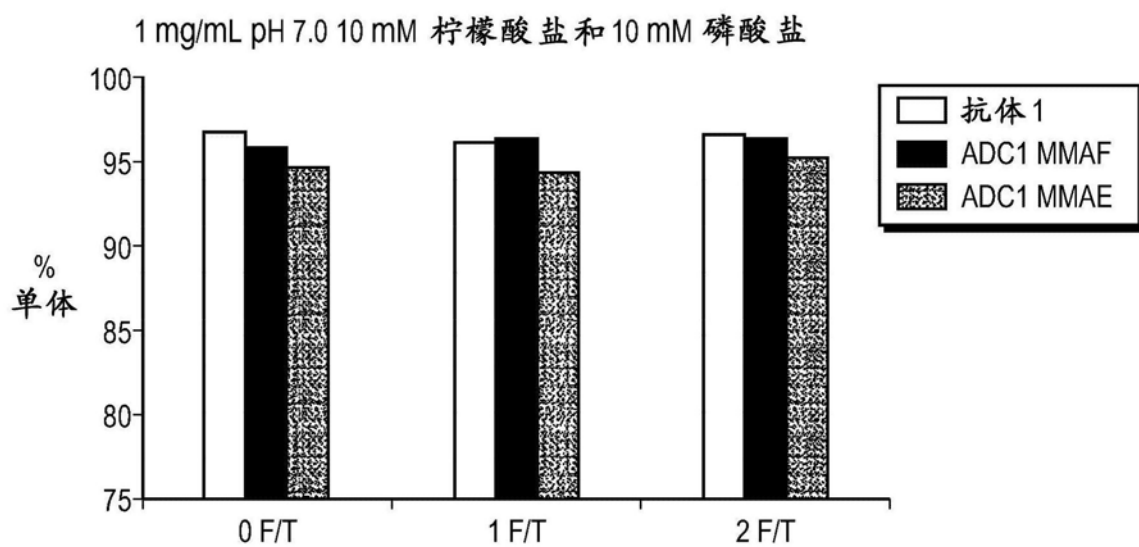


图8B

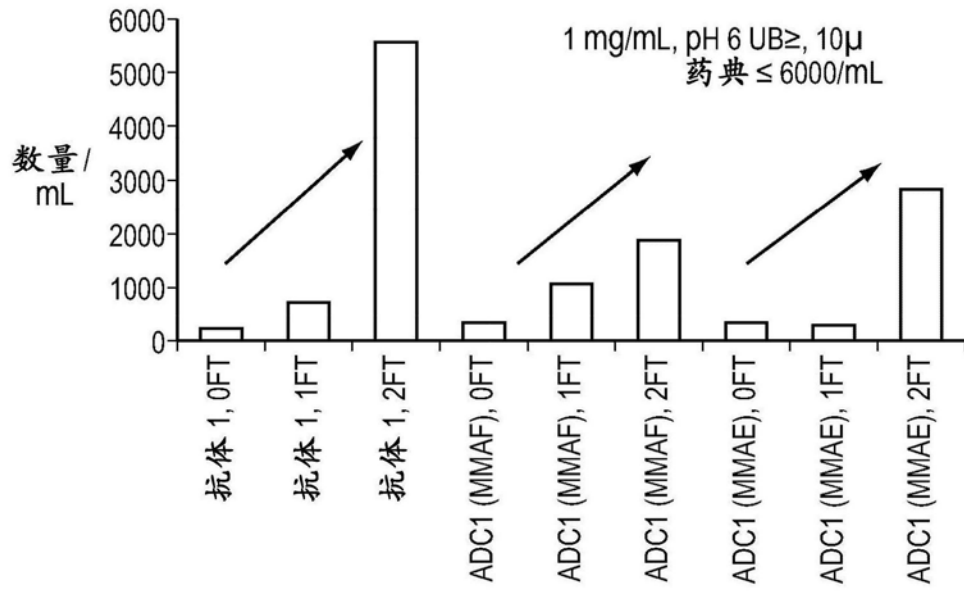


图9A

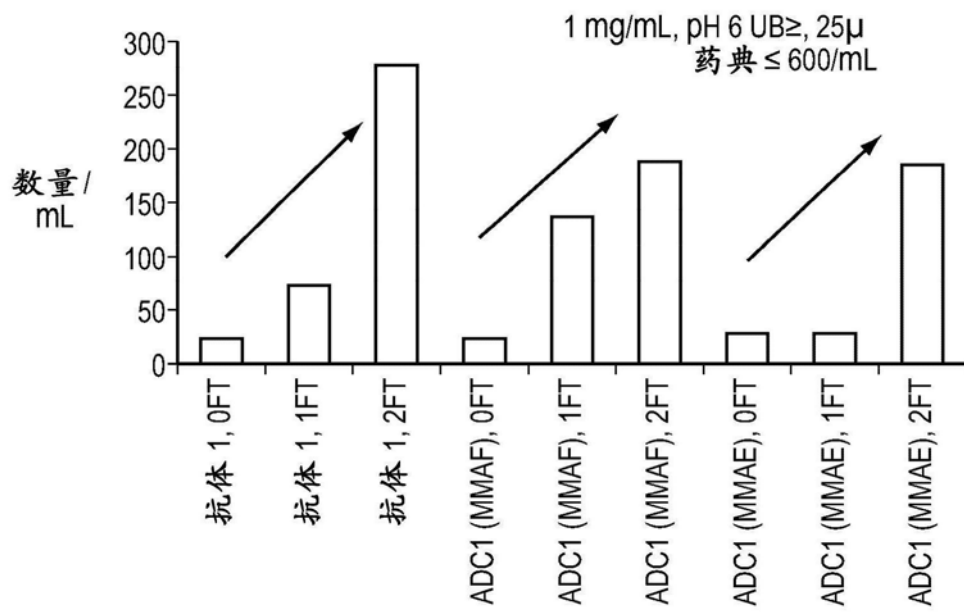


图9B