(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113677364 B
(45)授权公告日 2024.07.05

(21)申请号 201980091098.7
(22)申请日 2019.10.15
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113677364 A
(43)申请公布日 2021.11.19
(30)优先权数据
62/774,819 2018.12.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/056214 2019.10.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/117373 EN 2020.06.11
(73)专利权人 艾更斯司股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 思进公司

(72)发明人 O·麦伽维 G·莱特纳斯瓦弥
孙迎庆 M·R·范施拉凡迪克

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 钱文宇 李政璋
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 9/08(2006.01)
A61K 9/19(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)

(56)对比文件
US 2012078028 A1,2012.03.29
US 2016311919 A1,2016.10.27
US 2015353640 A1,2015.12.10

审查员 汪豪杰

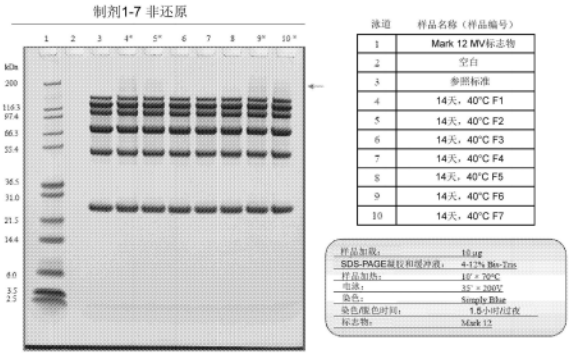
权利要求书4页 说明书89页
序列表（电子公布） 附图25页

(54)发明名称

包含抗191P4D12抗体药物偶联物的药物组合物及其使用方法

(57)摘要

一种药物组合物,其包含抗体药物偶联物,所述药物抗体偶联物包含与单甲基澳瑞他汀E(MMAE)的一个或多个单元偶联的能与191P4D12结合的抗体或其抗原结合片段,和药学上可接受的赋形剂,其包含L-组氨酸,聚山梨醇酯-20(吐温-20),和海藻糖二水合物和蔗糖之至少一者。



CN 113677364 B

1. 一种药物组合物,其包含:

(a)抗体药物偶联物,其包含与单甲基澳瑞他汀E(MMAE)的一个或多个单元偶联的能与191P4D12结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的重链中可变区的互补决定区(CDR),并且所述轻链可变区包含由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的轻链中可变区的CDR;和

(b)药学上可接受的赋形剂,其包含5-50mM的L-组氨酸,0.001-0.1%(w/v)的吐温-20,4-7%(w/v)的海藻糖二水合物和HCl,其中pH为在15-27℃时5.5-6.5。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述抗体或其抗原结合片段包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:9的CDR H1,含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的CDR H2,含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的CDR H3;含有氨基酸序列SEQ ID NO:12的CDR L1,含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的CDR L2,和含有氨基酸序列SEQ ID NO:14的CDR L3。

3. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含从SEQ ID NO:7第20个氨基酸到第136个氨基酸范围的氨基酸序列,而所述轻链可变区包含从SEQ ID NO:8第23个氨基酸到第130个氨基酸范围的氨基酸序列。

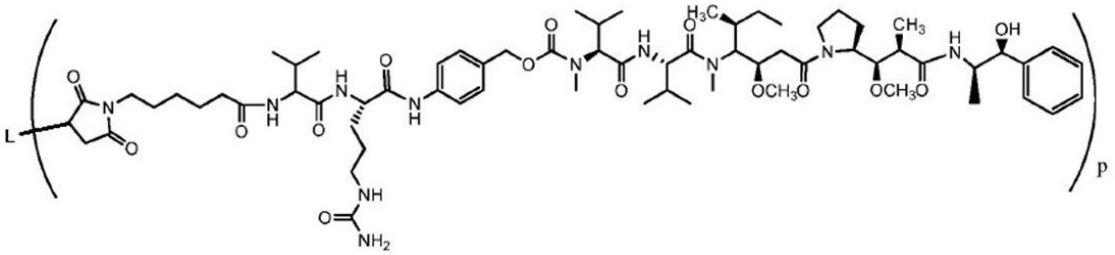
4.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述抗体包括重链和轻链,所述重链包含从SEQ ID NO:7第20个氨基酸到第466个氨基酸范围的氨基酸序列,而所述轻链包含从SEQ ID NO:8第23个氨基酸到第236个氨基酸范围的氨基酸序列。

5.如权利要求1-4中任一项所述的药物组合物,其中,所述抗原结合片段是Fab、F(abc)$_2$、Fv或scFv。

6.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述抗体是完全人抗体。

7.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述抗体或其抗原结合片段是重组产生的。

8.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述抗体药物偶联物具有如下结构:



其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10。

9.如权利要求8所述的药物组合物,其中,所述p是2-8。

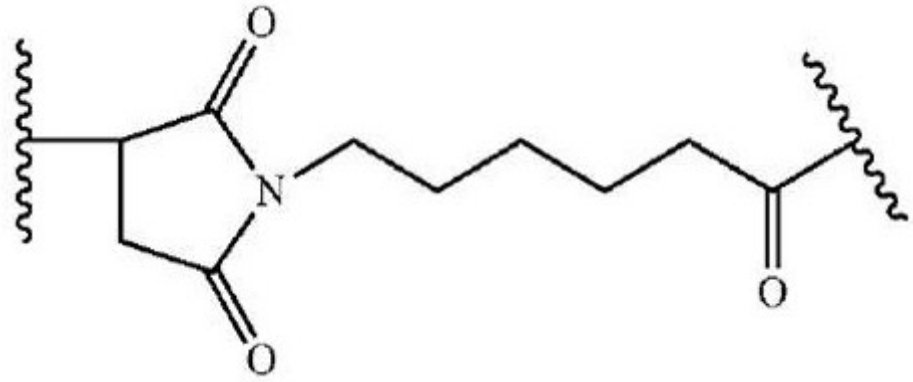
10.如权利要求8所述的药物组合物,其中p是3.8。

11.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述抗体或抗原结合片段通过接头连接单甲基澳瑞他汀E(MMAE)的各个单元。

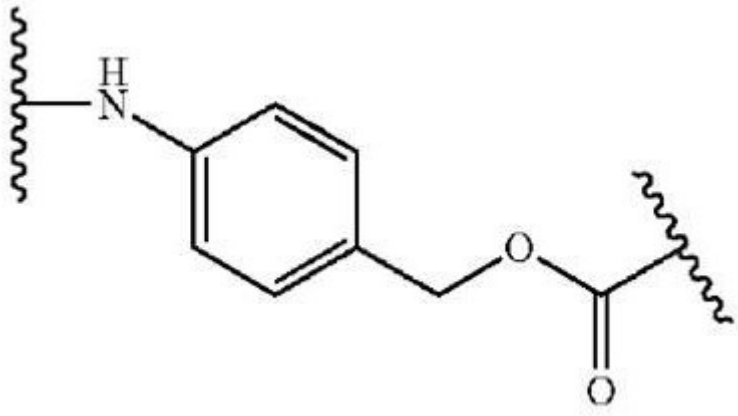
12.如权利要求11所述的药物组合物,其中,接头是酶可裂解接头,并且其中所述接头与所述抗体或其抗原结合片段的硫原子形成键。

13.如权利要求11所述的药物组合物,其中,所述接头具有下式:-A_a-W_w-Y_y-;其中-A-是延伸体单元,a是0或1;-W-是氨基酸单元,w是0-12内的整数,和-Y-是间隔单元,y是0、1或2。

14.如权利要求13所述的药物组合物,其中,所述延伸体单元具有下述式(I)结构;所述氨基酸单元是缬氨酸瓜氨酸;和所述间隔单元是包含下述式(2)结构的PAB基团:



式(1)



式(2)。

15.如权利要求13所述的药物组合物,其中,所述延伸体单元与所述抗体或其抗原结合片段的硫原子形成键;并且其中所述间隔单元通过氨基甲酸酯基团与MMAE连接。

16.如权利要求1所述的药物组合物,其以1-20 mg/mL的浓度包含所述抗体药物偶联物。

17.如权利要求16所述的药物组合物,其以5-15 mg/mL的浓度包含所述抗体药物偶联物。

18.如权利要求16所述的药物组合物,其以8-12 mg/mL的浓度包含所述抗体药物偶联物。

19.如权利要求16所述的药物组合物,其以10 mg/mL的浓度包含所述抗体药物偶联物。

20.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述L-组氨酸以10-40 mM的范围存在。

21.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述L-组氨酸以15-35 mM的范围存在。

22.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述L-组氨酸以15-30 mM的范围存在。

23.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述L-组氨酸以15-25 mM的范围存在。

24.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述L-组氨酸以20 mM存在。

25.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述吐温-20的浓度在0.0025 - 0.075% (v/v)的范围中。

26.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述吐温-20的浓度在0.005 - 0.05% (v/v)的范围中。

27.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述吐温-20的浓度在0.01 - 0.03% (v/v)

的范围中。

28.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述吐温-20的浓度在0.02% (v/v)的范围中。

29.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述海藻糖二水合物以4 - 6% (w/v)的范围存在。

30.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述海藻糖二水合物以5.5% (w/v)存在。

31.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述药物组合物的pH的范围为5.7 - 6.3。

32.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述药物组合物的pH为6.0。

33.如权利要求31或32所述的药物组合物,其中,所述pH取自室温。

34.如权利要求31或32所述的药物组合物,其中,所述pH取自25℃。

35.如权利要求1所述的药物组合物,其包含20 mM L-组氨酸,0.02% (w/v) 吐温-20,和5.5% (w/v)海藻糖二水合物。

36.如权利要求35所述的药物组合物,其中,所述pH在室温下为6.0。

37.如权利要求35所述的药物组合物,其中,所述pH在25℃下为6.0。

38.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述药物组合物呈液体形式。

39.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述药物组合物是冻干的。

40.如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述药物组合物储存于-80℃、4℃、25℃或37℃。

41.一种通过冻干权利要求1所述的药物组合物制备的冻干组合物。

42.权利要求1-40中任一项所述的药物组合物的用途,用于制备治疗对象中癌症的制剂,其中所述癌症是结肠癌,胰腺癌,卵巢癌,肺癌,膀胱癌,乳腺癌,食道癌,头癌,或颈癌,且所述癌症是具有表达191P4D12的肿瘤细胞的癌症。

43.如权利要求42所述的用途,其中,所述对象是人。

44.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是结肠癌。

45.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是胰腺癌。

46.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是卵巢癌。

47.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是肺癌。

48.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是膀胱癌。

49.如权利要求48所述的用途,其中,所述膀胱癌是晚期膀胱癌。

50.如权利要求48所述的用途,其中,所述膀胱癌是转移性膀胱癌。

51.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是乳腺癌。

52.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是食道癌。

53.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是头癌。

54.如权利要求43所述的用途,其中,所述癌症是颈癌。

55.如权利要求42所述的用途,其中向所述对象给予第二治疗剂。

56.如权利要求55所述的用途,其中,所述第二治疗剂是免疫检查点抑制剂。

57.如权利要求56所述的用途,其中,所述免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂。

58.如权利要求57所述的用途,其中,所述免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂。

59.如权利要求58所述的用途,其中,所述PD-1抑制剂是纳武单抗。

60.如权利要求57所述的用途,其中,所述免疫检查点抑制剂是PD-L1抑制剂。

61.如权利要求60所述的用途,其中,所述PD-L1抑制剂选自下组:阿特珠单抗、阿维鲁单抗和度伐鲁单抗。

62.如权利要求42所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1 - 10 mg/kg对象体重的剂量给予。

63.如权利要求62所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1 - 5 mg/kg对象体重的剂量给予。

64.如权利要求62所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1 - 2.5 mg/kg对象体重的剂量给予。

65.如权利要求62所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1 - 1.25 mg/kg对象体重的剂量给予。

66.如权利要求62所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1 mg/kg对象体重的剂量给予。

67.如权利要求62所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1.25 mg/kg对象体重的剂量给予。

68.如权利要求62所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物通过静脉内注射或输注给予。

69.如权利要求68所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物在30分钟内通过静脉内注射或输注给予,每三周周期两次。

70.如权利要求69所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物于每三周周期的第1天和第8天,在30分钟内通过静脉内注射或输注给予。

71.如权利要求70所述的用途,其包括于每三周周期的第1天通过静脉内注射或输注给予免疫检查点抑制剂。

72.如权利要求71所述的用途,其中,所述免疫检查点抑制剂在30分钟或60分钟以100 mg - 1500的量给予。

73.如权利要求68所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物在30分钟内通过静脉内注射或输注给予,每四周周期三次。

74.如权利要求73所述的用途,其中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物于每四周周期的第1天、第8天和第15天,在30分钟内通过静脉内注射或输注给予。

75.如权利要求74所述的用途,其包括通过静脉内注射或输注给予免疫检查点抑制剂。

包含抗191P4D12抗体药物偶联物的药物组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年12月3日提交的美国临时专利申请序列号62/774,819的优先权,其公开通过引用全文纳入本文。

1.技术领域

[0003] 本文提供了抗191P4D12抗体药物偶联物的药物组合物。本文还提供了使用该药物组合物的方法。

[0004] 2.背景

[0005] 药物物质通常作为制剂的一部分与具有不同和特定药物功能的一种或多种其他试剂联用。药物赋形剂具有各种功能并以多种不同方式对药物制剂作出贡献,例如,增溶、稀释、增稠、稳定、保存、着色、调味等。在配制活性药物物质时可考虑的性质包括生物利用度、易制性、易给药性、剂型稳定性。由于所配制的活性药物物质的不同性质,剂型通常需要专门针对活性药物定制的药物赋形剂,以实现有利的物理和药学性质。

[0006] 因此,需要具有有利物理和药物性质的抗191P4D12抗体-药物偶联物的药物组合物。本发明满足该需求,并且还提供了相关优点。

3.发明内容

[0007] 在一个方面中,本文提供了药物组合物,其包含(a)抗体药物偶联物,其包含与单甲基澳瑞他汀E(MMAE)的一个或多个单元偶联的能与191P4D12结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:7中所示重链可变区的互补决定区(CDR)的氨基酸序列的CDR,并且所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:8中所示轻链可变区的CDR的氨基酸序列的CDR;和(b)药学上可接受的赋形剂,其包含L-组氨酸,聚山梨醇酯-20(吐温-20),和海藻糖二水合物和蔗糖两者之至少一者。

[0008] 在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包括:含有氨基酸序列SEQ ID NO:9的CDR H1,含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的CDR H2,含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的CDR H3;含有氨基酸序列SEQ ID NO:12的CDR L1,含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的CDR L2,和含有氨基酸序列SEQ ID NO:14的CDR L3。

[0009] 在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含从SEQ ID NO:7第20个氨基酸(谷氨酸)到第136个氨基酸(丝氨酸)范围的氨基酸序列,而所述轻链可变区包含从SEQ ID NO:8第23个氨基酸(天冬氨酸)到第130个氨基酸(精氨酸)范围的氨基酸序列。

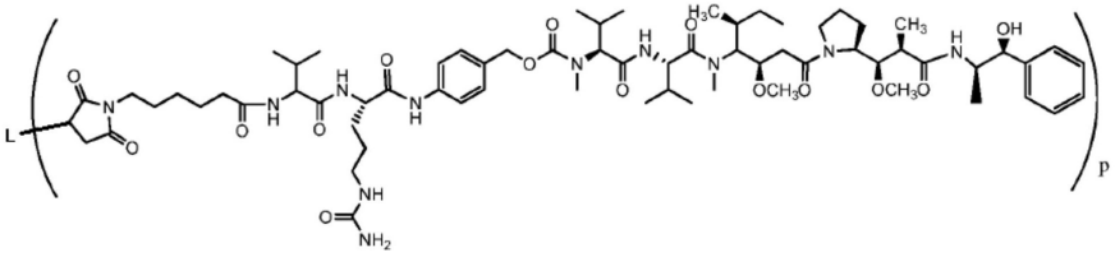
[0010] 在一些实施方式中,所述抗体包括重链和轻链,所述重链包含从SEQ ID NO:7第20个氨基酸(谷氨酸)到第466个氨基酸(赖氨酸)范围的氨基酸序列,而所述轻链包含从SEQ ID NO:8第23个氨基酸(天冬氨酸)到第236个氨基酸(半胱氨酸)范围的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方式中,抗原结合片段是Fab、$F(ab')_2$、Fv或scFv片段。

[0012] 在一些实施方式中,抗体是完全人抗体。

[0013] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段是重组产生的。

[0014] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物具有下述结构:

[0015] 

[0016] 其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10。

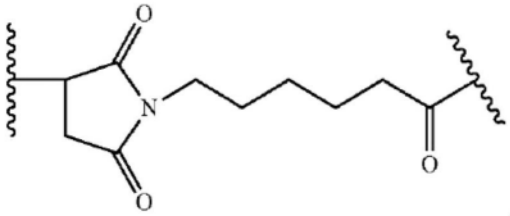
[0017] 在一些实施方式中,p是2-8。

[0018] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段通过接头连接单甲基澳瑞他汀E(MMAE)的各个单元。

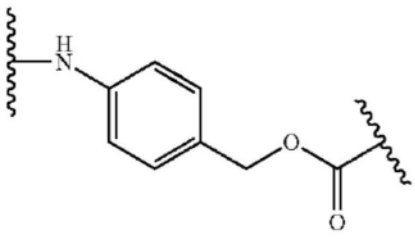
[0019] 在一些实施方式中,接头是酶可裂解接头,并且在一个实施方式中,所述接头与所述抗体或其抗原结合片段的硫原子形式键。

[0020] 在一些实施方式中,接头具有下式:-A_a-W_w-Y_y-;其中-A-是延伸体单元(stretcher unit),a是0或1;-W-是氨基酸单元,w是0-12内的整数,和-Y-是间隔单元,y是0、1或2。

[0021] 在一些实施方式中,所述延伸体单元具有下述式(I)结构;所述氨基酸单元是缬氨酸瓜氨酸;和所述间隔单元是具有下述式(2)结构的PAB基团:



式(1)

[0022] 

式(2)。

[0023] 在一些实施方式中,所述延伸体单元与所述抗体或其抗原结合片段的硫原子形成键;并且其中所述间隔单元通过氨基甲酸酯基团与MMAE连接。

[0024] 在一些实施方式中,所述抗体药物偶联物包含1-10个MMAE单元/抗体或其抗原结合片段。

[0025] 在一些实施方式中,所述抗体药物偶联物包含2-8个MMAE单元/抗体或其抗原结合片段。

[0026] 在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约1-约20mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约5-约15mg/mL的抗体药物偶联物。在其它实施方

式中,药物组合物包含浓度为约8-约12mg/mL的抗体药物偶联物。在其它实施方式中,药物组合物包含浓度为约10mg/mL的抗体药物偶联物。

[0027] 在一些实施方式中,L-组氨酸以约5-约50mN的范围存在。在其它实施方式中,L-组氨酸以约10-约40mN的范围存在。在其它实施方式中,L-组氨酸以约15-约35mN的范围存在。在其它实施方式中,L-组氨酸以约15-约30mN的范围存在。在其它实施方式中,L-组氨酸以约15-约25mN的范围存在。在其他实施方式中,L-组氨酸以约20mM存在。

[0028] 在一些实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.001-约0.1%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.0025-约0.075%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.005-约0.05%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.01-约0.03%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.02%(v/v)。

[0029] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物包含海藻糖二水合物。在一些实施方式中,海藻糖二水合物以约1-约20%(w/v)的范围存在。在一些实施方式中,海藻糖二水合物以约2-约15%(w/v)的范围存在。在其它实施方式中,海藻糖二水合物以约3-约10%(w/v)的范围存在。在其它实施方式中,海藻糖二水合物以约4-约6%(w/v)的范围存在。在其他实施方式中,海藻糖二水合物以约5.5%(w/v)存在。

[0030] 在一些实施方式中,海藻糖二水合物以约50mM-约300mM的范围存在。在一些实施方式中,海藻糖二水合物以约75mM-约250mM的范围存在。在其它实施方式中,海藻糖二水合物以约100mM-约200mM的范围存在。在其它实施方式中,海藻糖二水合物以约130mM-约150mM的范围存在。在其他实施方式中,海藻糖二水合物以约146mM存在。

[0031] 在一些实施方式中,药物组合物包含蔗糖。在一些实施方式中,蔗糖以约1-约20%(w/v)的范围存在。在一些实施方式中,蔗糖以约2-约15%(w/v)的范围存在。在其它实施方式中,蔗糖以约3-约10%(w/v)的范围存在。在其它实施方式中,蔗糖以约4-约6%(w/v)的范围存在。在其他实施方式中,蔗糖以约5.5%(w/v)存在。

[0032] 在一些实施方式中,蔗糖以约50mM-约300mM的范围存在。在其它实施方式中,蔗糖以约75mM-约250mM的范围存在。在其它实施方式中,蔗糖以约100mM-约200mM的范围存在。在其它实施方式中,蔗糖以约130mM-约150mM的范围存在。在其他实施方式中,蔗糖以约146mM存在。

[0033] 在一些实施方式中,药物组合物的pH范围为约5.5-约6.5。在一些实施方式中,药物组合物的pH范围为约5.7-约6.3。在其它实施方式中,药物组合物的pH为约6.0。

[0034] 在一些实施方式中,pH取自室温下。在一些实施方式中,pH取自约15℃-约27℃下。在其它实施方式中,pH取自约4℃下。在其它实施方式中,pH取自约25℃下。

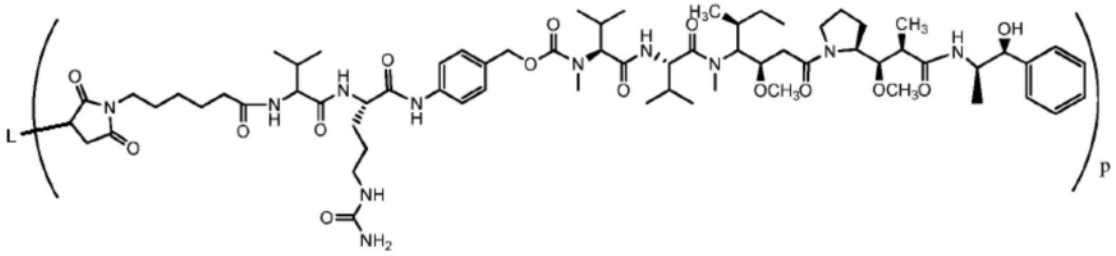
[0035] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物包含盐酸(HCl)。在一些实施方式中,pH通过HCl调节。

[0036] 在其它实施方式中,本文提供的药物组合物包含琥珀酸。在一些实施方式中,pH通过琥珀酸调节。

[0037] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,和约5.5%(w/v)海藻糖二水合物或约5%(w/v)蔗糖两者中的至少一种。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物还包含HCl或琥珀酸。在一些实施方式中,pH在室温下为约6.0。在其它实施方式中,pH在25℃下为约6.0。

[0038] 在一些具体实施方式中,本文提供的药物组合物包含:

[0039] (a)具有下述结构的抗体药物偶联物:

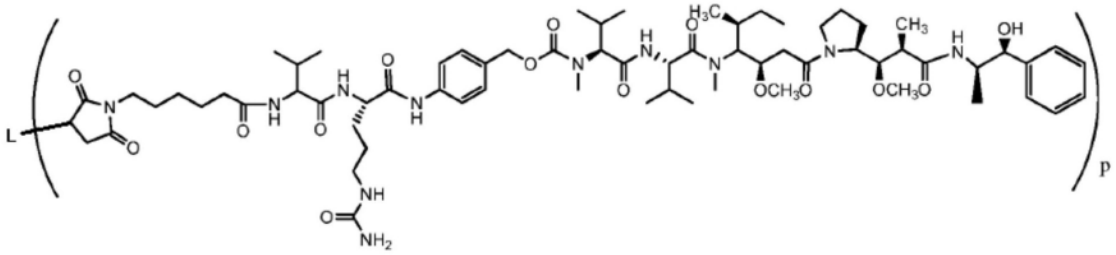
[0040] 

[0041] 其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10;和(b)药学上可接受的赋形剂,其包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约5.5%(w/v)海藻糖二水合物和HCl,其中pH在25℃下为约6.0。

[0042] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物的浓度为约10mg/mL。

[0043] 在其它具体实施方式中,本文提供的药物组合物包含:

[0044] (a)包含下述结构的抗体药物偶联物:

[0045] 

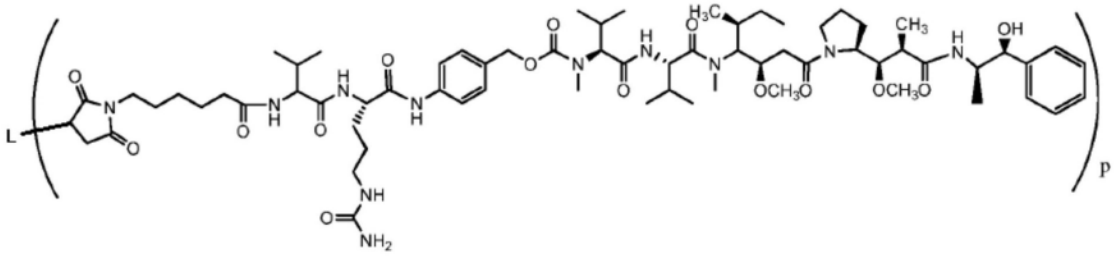
[0046] 其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10;和

[0047] (b)药学上可接受的赋形剂,其包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约5.5%(w/v)海藻糖二水合物和琥珀酸,其中pH在25℃下为约6.0。

[0048] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物在本文提供的药物组合物中的浓度为约10mg/mL。

[0049] 在其它具体实施方式中,本文提供的药物组合物包含:

[0050] (a)包含下述结构的抗体药物偶联物:

[0051] 

[0052] 其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10;和

[0053] (b)药学上可接受的赋形剂,其包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约5.0%(w/v)蔗糖和HCl,其中pH在25℃下为约6.0。

[0054] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物在本文提供的药物组合物中的浓度为约10mg/mL。

[0055] 一些实施方式中,本文提供的药物组合物呈液体形式。

[0056] 在其它实施方式中,本文提供的药物组合物是冻干的。

[0057] 在另一方面,本文提供的是冻干组合物,其通过冷冻干燥本文提供的药物组合物制备。

[0058] 在一些实施方式中,药物组合物储存于-80℃、4℃、25℃或37℃。

[0059] 在另一方面中,提供了一种预防或治疗对象中疾病或病症的方法,其包括向所述对象给予有效量的本文提供的药物组合物。

[0060] 在一些实施方式中,对象是人对象。

[0061] 在一些实施方式中,癌症是实体瘤。在一些实施方式中,癌症是结肠癌,胰腺癌,卵巢癌,肺癌,膀胱癌,乳腺癌,食道癌,头癌,或颈癌。

[0062] 在具体实施方式中,癌症是结肠癌。在具体实施方式中,癌症是胰腺癌。在具体实施方式中,癌症是卵巢癌。在具体实施方式中,癌症是肺癌。在一些实施方式中,肺癌是小细胞肺癌。在具体实施方式中,癌症是膀胱癌。在具体实施方式中,癌症是晚期膀胱癌。在具体实施方式中,癌症是转移性膀胱癌。在具体实施方式中,癌症是乳腺癌。在具体实施方式中,癌症是食道癌。在具体实施方式中,癌症是头癌。在具体实施方式中,癌症是颈癌。在具体实施方式中,癌症是表达191P4D12的肿瘤细胞。

[0063] 在一些实施方式中,本文提供的方法进一步包括向对象给予第二治疗剂。在一些实施方式中,第二治疗剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施方式中,免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂。在其它实施方式中,免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂。在其他实施方式中,PD-1抑制剂是派姆单抗(pembrolizumab)或纳武单抗(nivolumab)。在其它实施方式中,免疫检查点抑制剂是PD-L1抑制剂。在其他实施方式中,PD-L1抑制剂选自下组:阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)和度伐鲁单抗(durvalumab)。

[0064] 在一些实施方式中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1-10mg/kg对象体重的剂量给予。在其它实施方式中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1-5mg/kg对象体重的剂量给予。在其它实施方式中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1-2.5mg/kg对象体重的剂量给予。在一些实施方式中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以1-1.25mg/kg对象体重的剂量给予。在一些实施方式中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以约1mg/kg对象体重的剂量给予。在一些实施方式中,配制在所述药物组合物中的所述抗体药物偶联物以约1.25mg/kg对象体重的剂量给予。

[0065] 在一些实施方式中,配制在药物组合物中的抗体药物偶联物通过静脉内(IV)注射或输注给予。

[0066] 在一些实施方式中,配制在药物组合物中的抗体药物偶联物在约30分钟内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每三周周期两次。在一些实施方式中,配制在药物组合物中的抗体药物偶联物在约30分钟内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每三周周期的第1天和第8天。在一些实施方式中,所述方法进一步包括通过静脉内(IV)注射或输注给予免疫检查点抑制剂,每三周周期的第1天。在一些实施方式中,免疫检查点抑制剂是派姆单抗,并且其中派姆单抗在约30分钟内以约200mg的量给予。在其它些实施方式中,免疫检查点抑制剂是阿特珠单抗,并且其中阿特珠单抗在约60分钟或30分钟内以约1200mg的量给予。

[0067] 在其它实施方式中,配制在药物组合物中的抗体药物偶联物在约30分钟内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每四周周期三次。在一些实施方式中,配制在药物组合物中的抗

体药物偶联物在约30分钟内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每四周周期的第1天、第8天和第15天。在一些实施方式中,所述方法进一步包括通过静脉内(IV)注射或输注给予免疫检查点抑制剂。在一些实施方式中,免疫检查点抑制剂是派姆单抗。在其它实施方式中,免疫检查点抑制剂是阿特珠单抗。

4.附图说明

[0068] 图1A、图1B、图1C和图1D描述了40℃下制剂F1-F14 14天稳定性研究的SDS-PAGE分析结果。

[0069] 图1E描述了6.1部分中描述的PR-HPLC研究的总结。

[0070] 图1F、图1G和图1H描述了40℃下制剂F1-F14的SE-HPLC分析结果。

[0071] 图2A描述了T0时制剂F4、F9和F14的振荡研究(shade study)结果。

[0072] 图2B描述了T14时制剂F4、F9和F14的循环冻融研究结果。

[0073] 图2C描述了通过HIAC测量的制剂F4、F9和F14的总累积计数/mL。

[0074] 图3A描述了制剂F4、F9和F14的残余水分分析结果。

[0075] 图3B描述了12周同时进行的BDS和DP制剂研究中的A280(浓度)结果。

[0076] 图3C描述了12周同时进行的BDS和DP制剂研究中的A330(浊度)结果。

[0077] 图3D描述了T0时BDS(冻干前)的SDS-PAGE分析结果。

[0078] 图3E描述了于-70℃或2-8℃下储存12周的BDS的SDS-PAGE分析结果。

[0079] 图3F描述了T0时冻干和重建后的DP的SDS-PAGE分析结果。

[0080] 图3G描述了于25℃或40℃下储存12周的DP(冻干和重建后)的SDS-PAGE分析结果。

[0081] 图3H描述了于2-8℃下储存12周的DP(冻干和重建后)的SDS-PAGE分析结果。

[0082] 图3I描述了于2-8℃和-70℃下储存的AGS-22M6E BDS以及于-8℃,25℃/60% RH和40℃/75%RH条件下储存12周的冻干AGS-22M6E的SE-HPLC分析结果。

[0083] 图4描述了填充体积为3.0和1.5mL的F4冻干制剂的SDS-PAGE分析结果。

[0084] 图5A描述了191P4D12蛋白的核苷酸和氨基酸序列。

[0085] 图5B描述了Ha22-2(2.4)6.1的重链和轻链的核苷酸和氨基酸序列。

[0086] 图5C描述了Ha22-2(2.4)6.1的重链和轻链的氨基酸序列。

5.具体实施方式

[0087] 在进一步描述本公开之前,应当理解的是,本公开并不限于本文所示具体实施方式,并且还应当理解的是,本文所用术语仅出于描述具体实施方式的目的,而不是限制性的。

[0088] 5.1定义

[0089] 本文所述或所引用的技术或方法包括本领域技术人员通常所熟知和/或一般通过常规方法采用的那些,例如,Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(第三版,2001);《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology)(Ausubel等编著,2003);《治疗性单克隆抗体:从实验室和到临床》(Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic)(An等2009);《单克隆抗体:方法和方案》(Monoclonal Antibodies:Methods and Protocols)(Albitar等2010);和

《抗体工程改造》(Antibody Engineering)卷1和2(Kontermann和Dübel编著,第2版,2010)中所述广泛应用的方法。

[0090] 除非另有定义,本文中所用的科技术语具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。出于解释该说明书目的,将应用以下术语的描述,并在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。如果所示术语的任何描述与通过引用纳入本文的任何文件相冲突,那么将以下文所示术语的描述为准。

[0091] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文可互换使用,并以最广泛的含义使用并且具体涵盖,例如,单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整单克隆抗体),具有多表位或单表位特异性的抗体组合物,多克隆或单价抗体,多价抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们表现出所需的生物活性),形成自至少两个完整的抗体、单链抗体和其片段,如下所述。抗体可以是人的,人源化的,嵌合的和/或亲和力(affinity)成熟的,以及来自其他物种的抗体,例如,小鼠和兔等。术语“抗体”旨在包括能够结合特异性分子抗原且包含两对相同的多肽链的免疫球蛋白类多肽内的B细胞的多肽产物,其中各对多肽链具有一条重链(约50-70kDa)和一条轻链(约25kDa),各链的各氨基末端部分包含约100-约130或更多氨基酸的可变区,并且各链的各羧基末端包含恒定区。参见例如,《抗体工程改造》(Antibody Engineering)(Borrebaeck编著,第2版1995);和Kuby,《免疫学》(Immunology)(第3版1997)。在具体实施方式中,特定分子抗原可以通过本文所提供的抗体结合,包括多肽或表位。抗体还包括但不限于,合成抗体,重组产生的抗体,骆驼化抗体,内抗体,抗-独特型(抗-Id)抗体,和上述任意一种的功能性片段(例如,抗原结合片段),其指保留衍生该片段的抗体的一些或全部结合活性的抗体重链或轻链多肽的部分。功能性片段(例如,抗原结合片段)的非限制性示例包括:单链Fv(scFv)(例如,包括多特异性,双特异性等),Fab片段,F(ab')片段,F(ab)$_2$片段,F(ab')$_2$片段,二硫键连接的Fv(dsFv),Fd片段,Fv片段,双抗体,三抗体,四抗体和迷你抗体。具体地,本文所提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋分子的免疫活性部分,例如,抗原结合结构域或含有结合抗原的抗原结合位点(例如,抗体的一个或多个CDR)的分子。这类抗体片段可以见于,例如,Harlow和Lane,《抗体实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual)(1989);《分子生物学和生物技术:全面案头参考》(Mol.Biology and Biotechnology:A Comprehensive Desk Reference)(Myers等,1995);Huston等,1993,Cell Biophysics22:189-224;Plückthun和Skerra,1989,Meth.Enzymol.178:497-515;和Day,高级免疫化学(Advanced Immunochemistry)(第2版1990)。本文所提供的抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚型(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。抗体可以是激动性抗体或拮抗性抗体。

[0092] 术语“单克隆抗体”指获自基本均一抗体群体的抗体,即除了存在少数可能天然发生的突变外,群体包含的单独抗体均是相同的。单克隆抗体具有针对单个抗原性位点的高度特异性。与可以包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相比,每一单克隆抗体针对抗原上单个决定簇。

[0093] ”抗原“是抗体可以选择性结合的结构。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或天然存在或合成的其他化合物。在一些实施方式中,靶抗原是多肽。在某些实施方式中,抗原与细胞相关,例如存在于细胞上或细胞中,例如癌细胞。

[0094] “完整”抗体是这样的抗体,其包含抗原结合位点以及CL和至少重链恒定区,CH1、CH2和CH3。恒定区可以包含人恒定区或其氨基酸序列变体。在某些实施方式中,完整抗体具有一种或多种效应功能。

[0095] 术语“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗原结合区域”和相似的术语指这样的抗体部分,其包含与抗原相互作用并赋予结合剂其对抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基(例如,CDR)。本文所用“抗原结合片段”包括“抗体片段”,其包含完整抗体的部分,例如完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的示例包括但不限于,Fab,Fab',F(ab')$_2$,和Fv片段;双抗体和二-双抗体(参见例如,Holliger等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.90:6444-48;Lu等,2005,J.Biol.Chem.280:19665-72;Hudson等,2003,Nat.Med.9:129-34;WO 93/11161;和美国专利号5,837,242和6,492,123);单链抗体分子(参见例如,美国专利号4,946,778;5,260,203;5,482,858;和5,476,786);双可变结构域抗体(参见例如,美国专利号7,612,181);单可变结构域抗体(sdAb)(参见例如,Woolven等,1999,Immunogenetics 50:98-101;和Streltsov等,2004,Proc Natl Acad Sci USA.101:12444-49);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0096] 术语“结合”或“缔合”指分子之间的相互作用,包括,例如,以形成复合物。例如,相互作用可以是非共价的相互作用,包括氢键、离子键、疏水相互作用和/或范德华相互作用。复合物还可包括通过共价或非共价键、相互作用或力保持在一起的两个或多个分子的结合。抗体上单个抗原结合位点和靶分子(如抗原)的单个表位之间的全部非共价相互作用的强度是抗体或功能性片段对于表位的亲和力。结合分子(例如,抗体)对于单克隆抗原的解离速率(k_{off})与结合速率(k_{on})比例(k_{off}/k_{on})是解离常数(K_D),其与亲和力成反比。K_D值越低,抗体的亲和力越高。K_D的值因抗体和抗原的不同复合物而异并取决于k_{on}和k_{off}。本文提供的抗体的解离常数K_D可以使用本文提供的任何方法或本领域技术人员熟知的任何其他方法确定。一个结合位点的亲和力常常并不反应抗体和抗原之间相互作用真正的强度。当含有多个、重复抗原决定簇的复合抗原,如多价抗原与含有多个结合位点的抗原接触之时,一个位点处的抗原与抗体的相互作用将增加第二位点处反应的可能性。多价抗体和抗原之间这类多重相互作用的强度称为亲合力(avidity)。

[0097] 与本文所述抗体或其抗原结合片段相关的术语,例如“结合”、“特异性结合”和类似术语在本文中也可互换使用,并且指特异性结合抗原的抗原结合结构域的结合分子,如多肽。结合或特异性结合抗原的抗体或抗原结合片段可与相关抗原交叉反应。在某些实施方式中,结合或特异性结合抗原的抗体或抗原结合片段与其它抗原不交叉反应。结合或特异性结合抗原的抗体或抗原结合片段可以通过例如,免疫试验、Octet®、Biacore®或本领域技术人员已知的其他技术鉴定。在一些实施方式中,使用实验技术如放射免疫试验(RIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)确定,当抗体或抗原结合片段以比任何交叉反应抗原更高的亲和力结合抗原时,该抗体或抗原结合片段结合或特异性地结合抗原。通常,特异性或选择性反应将为背景信号或噪声的至少两倍并且可以为超过背景10倍。参见例如,《免疫学基础》(Fundamental Immunology)332-36(Paul编著,第2版1989)关于结合特异性的讨论。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段与“非靶标”蛋白结合的程度将小于结合分子或抗原结合结构域与其特定靶抗原的结合的约10%,例如,如通过荧光活化的细胞分选(FACS)分析或RIA所确定。对于诸如“特异性结合”、“特异性地结合(至)”或“对……具有特异性”之类

的术语,其意指与非特异性相互作用显著不同的结合。例如,特异性结合可通过测定某分子的结合并与对照分子的结合进行比较来测量,对照分子通常是结构上相似但没有结合活性的分子。例如,可通过与靶标相似的对照分子(例如过量的未标记的靶标)的竞争来确定特异性结合。在这种情况下,如果标记靶标与探针的结合被过量的未标记靶标竞争性抑制,则表明特异性结合。结合抗原的抗体或抗原结合片段包括能够以足够的亲和力结合抗原的抗体或抗原结合片段,由此该结合分子能够用于例如靶向抗原的诊断剂。在某些实施方式中,结合抗原的抗体或抗原结合片段的解离常数(K_D)小于或等于1000nM、800nM、500nM、250nM、100nM、50nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段结合在不同物种的抗原之间(例如,人和食蟹猴物种之间)是保守的抗原的表位。

[0098] “结合亲和力”通常指分子(例如,结合蛋白,如抗体)的单个结合位点与其结合伴侣(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。结合分子X对其结合伴侣Y的亲和力通常可以通过解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的常用方法来测量,包括本文所述的那些方法。低亲和力抗体通常缓慢结合抗原并倾向于容易地解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并倾向于保持更长的结合。本领域已知测量结合亲和力的多种方法,其中任何一种都可用于本公开的目的。具体的说明性实施方式包括以下内容。在一个实施方式中,“K_D”或“K_D值”可以通过本领域已知的试验,例如通过结合试验来测量。K_D可以在RIA中测量,例如,使用感兴趣的抗体的Fab形式和其抗原(Chen等,1999,J.Mol Biol293:865-81)。测量K_D或K_D值还可以通过使用生物层干扰量度法(biolayer interferometry,BLI)或表面等离振子共振(SPR)试验,通过Octet®,使用例如Octet®QK384系统,或通过Biacore®,使用例如Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000。“on-速率”或“结合的速率“或“结合速率”或“kon”还可以使用上述相同的生物层干扰量度法(BLI)或表面等离振子共振(SPR)技术确定,使用例如,Octet®QK384、Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000系统。

[0099] 在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包含“嵌合”序列,其中重链和/或轻链的部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,同时,一条或多条链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,还包括这类抗体的片段,只要它们表现出所需的生物学活性(参加美国专利号4,816,567;和Morrison等,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-55)。

[0100] 在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包含非人(例如,鼠)抗体“人源化”形式的部分,其为嵌合抗体,包含人免疫球蛋白(例如,受体抗体),其中天然CDR残基被包含所需特异性、亲和力和性能的来自非人物种(例如,供体抗体)(如小鼠、大鼠、兔或非人哺乳动物)相应的CDR的残基所替换。在一些情形中,人免疫球蛋白的一个或多个FR区域残基替换成相应的非人残基。而且,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。人源化抗体重链或轻链可以包含基本上全部的至少一个或多个可变区,其中全部或基本上全部的CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR区,且全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的FR。在某些实施方式中,人源化抗体将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节,参见,Jones等.,

1986,Nature321:522-25;Riechmann等,1988,Nature 332:323-29;Presta,1992,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-96;Carter等,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89;美国专利号6,800,738;6,719,971;6,639,055;6,407,213;和6,054,297。

[0101] 在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包含“完全人抗体”或“人抗体”的部分,其中该术语在本文可以互换使用并且指包含人可变区和例如人恒定区的抗体。在具体实施方式中,该术语指包含人来源的可变区和恒定区的抗体。在某些实施方式中,“完全人”抗体还可以涵盖结合多肽并由核酸序列所编码的抗体,所述核酸序列为天然产生的人种系免疫球蛋白核酸序列体变体。术语“完全人抗体”包括包含对应人种系免疫球蛋白序列可变和恒定区的抗体,如Kabat等(参见,Kabat等(1991)《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,美国卫生与公共服务部,NIH公开出版号91-3242)所述。“人抗体”具有这样的氨基酸序列,其对应于人产生的抗体和/或已经使用用于制备人抗体的任何技术制备。人抗体的这一定义特特别排除含有非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter,1991,J.Mol.Biol.227:381;Marks等,1991,J.Mol.Biol.222:581)和酵母展示文库(Chao等,2006,Nature Protocols 1:755-68)。同样能够用于制备人单克隆抗体的方法述于Cole等,《单克隆抗体和癌症疗法》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)77(1985);Boerner等,1991,J.Immunol.147(1):86-95;和van Dijk和van de Winkel,2001,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74。人抗体可以通过将抗原给予这样的转基因动物制备,所述转基因动物已经修饰以响应抗原性攻击而产生这类抗体,但是其内源性基因座已经失效,例如,小鼠(参见例如,Jakobovits,1995,Curr.Opin.Biotechnol.6(5):561-66;Brüggemann和Taussing,1997,Curr.Opin.Biotechnol.8(4):455-58;和美国专利号6,075,181和6,150,584,关于XENOMOUSE™技术)。同样参见例如,Li等,2006,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:3557-62,关于经由人B细胞杂交瘤技术生成人抗体。

[0102] 在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包含“重组人抗体”的部分,其中该短于包括通过重组方法制备、表达、创造或分离的人抗体,诸如使用转染到宿主细胞的重组表达载体表达的抗体,分离自重组、组合人抗体库的抗体,分离自人免疫球蛋白基因转基因和/或转染色体(transchromosomal)动物(例如,小鼠或牛)的抗体(参见例如,Taylor,L.D.等(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295)或通过涉及切割人免疫球蛋基因序列成其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、创造或分离的抗体。这类重组人抗体可以具有源自人种系免疫球蛋序列的可变或恒定区(参见,Kabat等(1991)《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,美国卫生与公共服务部,NIH公开出版号91-3242)。然而,在某些实施方式中,这类重组人抗体经历体外诱变(或者,当使用人Ig序列转基因动物,体内体诱变)并因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是虽然衍生自或与人种系VH和VL序列相关,其可能并不天然出现在体内人抗体种系库(repertoire)内的序列。

[0103] 在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包含“单克隆抗体”的部分,其中本文所用的该术语指获自基本均一抗体群体的抗体,例如,除了以少量存在的可能天然发生的突变外,群体包含的单独抗体是相同的,并且各单克隆抗体通常将识别抗原上的单一表位。在具体实施方式中,本文所用“单克隆抗体”是有单一杂交瘤或其它细胞产生的抗体。术

语“单克隆”不限于生产抗体的任何特定方法。例如,能够用于本公开的单克隆抗体可以这样制备,通过首先由Kohler等,1975,Nature 256:495所述的杂交瘤方法,或者通过在细菌或真核动物或植物细胞中使用重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567)。也可通过例如Clackson等,Nature 352:624-28(1991)和Marks等,J.Mol.Biol.222:581-97(1991)所述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。本领域熟知用于制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其它方法,参见例如,《分子生物学简明方案》(Short Protocols in Molecular Biology)(Ausubel等编著,第5版.2002)。

[0104] 典型的4链抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成的异四聚体糖蛋白。在IgG的情况下,4-链单元通常约为150,000道尔顿。每条L链通过一共价二硫键与H链相连,而两条H链根据H链的同种型通过一个或多个二硫键彼此相连。各H链和L链也具有规则间隔的链内二硫桥。各H链具有N末端,可变结构域(VH),其后为各自为α和γ链的三个恒定结构域(CH),和μ和ε同种型的四个CH结构域。每条L链在N端具有可变结构域(VL),在其另一端具有恒定结构域(CL)。V_L与V_H对齐,C_L与重链的第一恒定结构域(C_{H1})对齐。某些特定氨基酸残基被认为会形成轻链可变结构域与重链可变结构域之间的界面。V_H和V_L的配对共同形成一个抗原结合位点。对于不同类型抗体的结构和特性,参见例如,《基础和临床免疫学》(Basic and Clinical Immunology)71(Stites等编著,第8版1994);和《免疫学》

[0105] (Immunobiology)(Janeway等编著,第5版.2001)。

[0106] 术语“Fab”或“Fab区”指结合抗原的抗体区。常规IgG通常包含两个Fab区,各自位于Y形IgG结构两个臂之一上。各Fab区通常由重链和轻链各自的一个可变区和一个恒定区组成。更具体地,Fab区中重链的可变区和恒定区为VH和CH1区,而Fab区中轻链的可变区和恒定区为VL区和CL区。Fab区中的VH、CH1、VL和CL可以以多种方式排列以赋予根据本公开的抗原结合能力。例如,类似于常规IgG的Fab区,VH和CH1区可以在一个多肽上,而VL和CL区可以在单独的多肽上。或者,VH、CH1、VL和CL区可以在相同的多肽上并以不同的顺序定向,如下文部分更详细地描述。

[0107] 术语“可变区”、“可变结构域”、“V区域”或“V结构域”指通常位于轻链或重链的氨基末端且在重链中长度为约120 -130个氨基酸和在轻链中长度为约100 -110个氨基酸抗体轻链或重链的部分,并且用于各特定抗体与其特定抗原的特异性和结合。重链的可变区可以称之为“VH”。轻链的可变区可以称之为“VL”。术语“可变”指可变区的某些区段在序列上在抗体间广泛变化的事实。V区介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性在可变区的110个氨基酸范围内并不是均匀分布的。相反,V区由称之为框架区(FR)的约15-30个氨基酸的较少可变的(例如,相对稳定的)的延伸组成,这些延伸被称之为“超变区”长度各为9-12个氨基酸具有较大可变性(例如,极致可变性)的较短区域分隔。重链和轻链的可变结构域各包含四个FR区,主要采用β折叠构型,通过三个超变区相连,形成环间连接,并在某些情况下形成β折叠结构的部分。各链中的超变区被FR聚集在一起,紧密相邻,与另一条链的超变区一起形成抗体的抗原结合位点(参见例如,Kabat等,《免疫学感兴趣的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)(第5版1991))。恒定区并不直接参与抗体与抗原的结合,但是展现出各种效应物功能,诸如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。不同抗体之间的可变区在序列上有很大差异。在具体实施方式中,可变区是人可变区。

[0108] 术语“根据Kabat编号的可变区残基”或“根据Kabat编号的氨基酸位置”及其变化形式指用于Kabat等,引用如上中抗体汇编的重链可变区或轻链可变区的编码系统。使用该编号系统,实际的线性氨基酸序列可包含更少或额外的氨基酸,对应可变域FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可包括残基52之后的单个氨基酸插入物(根据Kabat为残基52a)和在残基82之后的3个插入的残基(例如,根据Kabat为残基82a、82b和82c等)。可以通过在抗体序列的同源区域与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定给定抗体的残基Kabat编号。当表示可变结构域中的残基时,通常使用Kabat编号系统(大约为轻链的残基1-107和重链的残基1-113)(例如,Kabat等,引用如上)。当表示免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用"EU编号系统"或"EU索引"(例如,如Kabat等,引用如上中报道的EU索引)。“Kabat中的EU索引”指IgG 1EU抗体的残基编号。已经描述了其它编号系统,例如,通过AbM、Chothia、Contact、IMGT和AHon。

[0109] 术语“重链”当参照抗体使用时指约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包含约120-130或更多个氨基酸的可变区,而羧基末端部分包含恒定区。恒定区可以是5个不同类型(例如,同种型)之一,基于重链恒定区的氨基酸序列,称之为α、δ、ε、γ和μ。不同重链的大小不同:α、δ和γ包含大约450个氨基酸,而μ和ε包含大约550个氨基酸。当与轻链组合时,这些不同类型的重链产生5个熟知类型(例如,同种型)的抗体,分别为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包含4个亚型IgG,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0110] 术语“轻链”当参照抗体使用时指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包含约100-约110或更多个氨基酸的可变区,而羧基末端部分包含恒定区。轻链的大致长度为211-217个氨基酸。存在两种不同的类型,基于恒定结构域的氨基酸序列,称为κ或λ。

[0111] 如本文所用,术语“高变区”、“HVR”、“互补决定区”和“CDR”可互换使用。“CDR”指免疫球蛋白(Ig或抗体)VHβ-折叠框架的非框架区内的三个高变区(H1、H2或H3)之一,或抗体VLβ-折叠框架的非框架区域内的三个高变区(L1、L2或L3)之一。因此,CDR是散布在构架区序列内的可变区序列。

[0112] CDR区是本领域技术人员众所周知的并且已经由众所周知的编号系统定义。例如,Kabat互补决定区(CDR)基于序列变异性并且是最常用的(参见例如,Kabat等,同上)。Chothia指的则是结构环的位置(参见例如,Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.196:901-17)。取决于环的长度,当使用Kabat编号方法时,Chothia CDR-H1环的末端在H32和H34之间变化(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,那么环在32结束;如果仅存在35A,那么环在33结束;如果同时存在35A和35B,那么环在34结束)。AbM超变区表示Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,并且被牛津分子科技公司(Oxford Molecular)的AbM抗体建模软件所使用(参见例如,《抗体工程改造》(Antibody Engineering)第2卷(Kontermann和Dübel编著,第2版2010))。“Contact”超变区基于可变复合物晶体结构的分析。已经开发并广泛采用了另一通用编号系统ImMunoGeneTics(IMGT) InformationSystem® (Lafranc等,2003,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77)。IMGT是专供人类和其他脊椎动物的免疫球蛋(IG)、T细胞受体(TCR)和主要组织相容复合物(MHC)的整合信息系统。因此,就氨基酸序列和轻链或重链内的位置表示CDR。由于免疫球蛋白可变域结构内CDR的“位置”在物种之间是保守的并且存在于称为环的结构中,因此通过使用根据结构特征比对可变域序列的编号系统,很容易识别CDR和框架残基。该信息可以用于移植或替

换来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基到受体框架,其通常来自人抗体。Honegger和Plückthun,2001,J.Mol.Biol.309:657-70已经开发了额外的编号系统(AHon)。编号系统包括,例如,Kabat编号和IMGT独特编号系统,之间的对应关系为本领域技术人员所熟知(参见例如,Kabat,引用如上;Chothia和Lesk,引用如上;Martin,引用如上;Lefranc等,引用如上)。来自这些高变区或CDR各自的残基如下所述

[0113] 表30

[0114]

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

[0115] 给定CDR的边界可以变化,取决于用于识别的方案。因此,除非另有说明,给定抗体或其区域的术语“CDR”和“互补决定区”,例如可变区,以及抗体或其区域的单个CDR(例如,“CDR-H1、CDR-H2)”应理解为包括如上文所述的任何已知方案所定义的互补决定区。在一些情况中,指定用于识别一个或多个特定CDR的方案,例如由Kabat、Chothia或Contact方法定义的CDR。在其他情况中,给定CDR的特定氨基酸序列。

[0116] 超变区可以包含如下“延伸的超变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3),和VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。

[0117] 术语“恒定区”或“恒定结构域”指不直接参与抗体与抗原的结合但是展现出各种效应物功能,诸如与Fc受体相互作用的轻链和重链的羧基末端部分。该术语是指免疫球蛋白分子的部分,其包含相对于免疫球蛋白的其他部分(可变区)更保守的氨基酸序列,其包含抗原结合位点。恒定区可包含重链的CH1、CH2和CH3区和轻链的CL区。

[0118] 术语“框架”或“FR”指侧接CDR的那些可变区残基。例如,FR残基存在于嵌合、人源化、人、结构域抗体、双抗体、线性抗体和双特异性抗体。FR残基是除了超变区残基或CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0119] 如本文所用术语“Fc区”定义了免疫球蛋白重链的C-末端区域,包括例如,天然序列Fc区,重组Fc区域和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链Fc区的边界可能会有所不同,但人IgG重链Fc区通常定义为从Cys226位置的氨基酸残基或从Pro230延伸到其羧基末端。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可以被去除,例如,在抗体的生产或纯化过程中,或通过重组工程改造编码抗体重链的核酸。因此,完整抗体的组合物可包含去除了所有

K447残基的抗体群,去除了K447残基的抗体群,和包含具有和不具有K447残基的抗体混合物的抗体群。功能性“Fc区”具有天然序列Fc区的“效应物功能”。示例性的“效应功能”包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;下调细胞表面受体(例如,B细胞受体)等。这类效应功能通常需要令Fc区与结合区或结合结构域(例如,抗体可变区或结构域)结合,并且可以使用本领域技术人员已知的各种试验进行评估。变体“Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失)而与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在某些实施方式中,变体Fc区相比天然序列Fc区或相比亲本多肽的Fc区有至少一处氨基酸取代,例如天然序列Fc区或亲本多肽Fc区中约1至约10处氨基酸取代,或约1至约5处氨基酸取代。本文的变体Fc区可与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%的同源性,或与其至少约90%的同源性,例如,与其至少约95%的同源性。

[0120] 如本文所用,“表位”是本领域中的术语并且指结合分子(例如,抗体)可以特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是线性表位或构象、非线性或不连续表位。例如,在多肽抗原的情况下,表位可以是多肽的连续氨基酸(“线性”表位)或者表位可以包含来自多肽的两个或更多个非连续区域的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位)。本领域技术人员将理解的是,一般而言,线性表位可能依赖于或不依赖于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施方式中,结合分子与氨基酸组结合,无论它们是否在天然三维蛋白质结构中折叠。在其他实施方式中,结合分子需要构成表位的氨基酸残基以显示特定构象(例如,弯曲、扭曲、转弯或折叠),从而识别和结合表位。

[0121] 术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并指代任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性或支化聚合物,可以包含经修饰的氨基酸,并且可间插有非氨基酸。该术语也包括已经天然或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰。定义中还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物的多肽,包括但不限于非天然氨基酸,以及本领域已知的其他修饰。应当理解的是,因为本公开的多肽可以基于抗体或免疫球蛋白超家族的其他成员,所以在某些实施方式中,“多肽”可以作为单链或作为两个或更多个相关链出现。

[0122] 术语“载体”指用于携带或包含核酸序列的物质,包括例如,编码本文所述结合分子(例如,抗体)的核酸序列,从而将核酸序列导入宿主细胞。例如,适用的载体包括:表达载体,质粒,噬菌体载体,病毒载体,附加体和人工染色体,其可包括可操作用于稳定整合到宿主细胞染色体中的选择序列或标志物。此外,载体可以包括一种或多种可选择标志物基因和适当的表达控制序列。例如,可以包括的可选择标志物基因提供了对抗体或毒素的抗性,补充营养缺陷,或提供生长培养基中不存在的关键营养素。表达控制序列可以包括本领域熟知的组成型和诱导型启动子,转录增强子,转录终止子等。当两个或更多个核酸分子将共表达(例如,抗体重链和轻链,或者抗体VH和VL)时,可以将核酸分子插入,例如,单个表达载体或分开的表达载体中。对于单一载体表达,编码核酸可以与一种共有表达控制序列操作性地连接或与不同的表达控制序列连接,如一种诱导型启动子和一种组成型启动子。可以使用本领域熟知的方法确认将核酸分子引入宿主细胞。这类方法包括例如,核酸分析,如Northern印迹或mRNA的聚合酶链式反应(PCR)扩增,针对基因产物表达的免疫印迹,或其他合适的分析性方法以测试导入的核酸序列或其对应的基因产物的表达。本领域技术人员应当理解的是,核酸分子以足够的量表达以产生所需产物,并且应当进一步理解的是,使用本

领域所熟知的方法,可以优化表达水平以获得足够的表达。

[0123] 本文所用术语“宿主”指动物,如哺乳动物(例如,人)。

[0124] 本文所用术语“宿主细胞”指可以经核酸分子转染的特定对象细胞以及这类细胞的后代或潜在后代。由于在后续世代或整合核酸分子到宿主细胞基因组中可能发生的突变或环境影响,这类细胞的后代可能与转染核酸分子的亲代细胞不同。

[0125] “分离核酸”是这样的核酸,例如,RNA、DNA或混合的核酸,其基本上分离自其他基因组DNA序列以及蛋白质或复合物如核糖体和聚合酶,其天然伴随着天然序列。“分离的”核酸分子是分离自存在于核酸分子天然来源的其他核酸分子的核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,如cDNA分子,可以在通过重组技术产生时,基本不含其它细胞物质,或培养基,或通过化学方法合成时,基本不含化学物质前体或其它化学物质。在具体实施方式中,一种或多种编码如本文所述的抗体的核酸分子被分离或纯化。该术语包括已从其天然存在环境中移除的核酸序列,并且包括重组或克隆的DNA分离物和化学合成的类似物或通过异源系统生物合成的类似物。基本上纯的分子可以包括该分子的分离形式。

[0126] 本文所用“多核苷酸”或“核酸”在本文可以互换使用,指代任何长度的核苷酸聚合物并包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰核苷酸或碱基、和/或它们的类似物,或是可由DNA或RNA聚合酶或通过合成反应纳入聚合物中的任何底物。多核苷酸可包括修饰核苷酸,如甲基化的核苷酸和其类似物。本文所用“寡核苷酸”指短的,通常为单链的,合成的多核苷酸,它们通常(但是不是必需)的长度小于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”彼此并不互相排斥。对于多核苷酸的上述描述同样也完全适用于寡核苷酸。产生本公开结合分子的细胞可以包括亲本杂交瘤细胞,以及细菌和真核宿主细胞,其中已经导入了编码抗体的核酸。除非另有说明,本文所公开的单链多核苷酸序列的左手端为5’端;双链多核苷酸序列的左手方向称作5’方向。新生RNA转录本5’至3’添加的方向称作转录方向;DNA链上这样的序列区域称作“上游序列”,所述序列区域包含与RNA转录本相同的序列并位于RNA转录本5’端的5’;DNA链上这样的序列区域称作“下游序列”,所述序列区域包含与RNA转录本相同的序列并位于RNA转录本3’端的3’。

[0127] 本文所用术语“药学上可接受的”表示经联邦或州政府管理机构批准,或《美国药典》(United States Pharmacopeia)、《欧洲药典》(European Pharmacopeia)或其它公认药典所列用于动物应用,更具体用于人。

[0128] “赋形剂”意指药学上可接受的物质材料、组合物或载剂,例如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或包封材料。例如,赋形剂包括:包封材料或添加剂,如吸收促进剂、抗氧化剂、结合剂、缓冲剂、运载体、涂覆剂、着色剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、调味剂、湿润剂、润滑剂、香料、防腐剂、推进剂、释放剂、杀菌剂、甜味剂、增溶剂、润湿剂及其混合物。术语“赋形剂”还可指稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全或不完全)或载剂。

[0129] 在一些实施方式中,赋形剂是药学上可接受的赋形剂。药学上上可接受的赋形剂的示例包括,缓冲液,如磷酸,柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如,少于约10个氨基酸残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如l-组氨酸,甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖,蔗糖,海藻糖二水合物,甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨糖醇;成盐的抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如

TWEEN™,聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™。药学上可接受的赋形剂的其它示例述于Remington和Gennaro,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(第18版1990)中。

[0130] 在一个实施方式中,每种组分在与药物制剂的其他成分相容的意义上是"药学上可接受的",并且适合与人和动物的组织或器官接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应、免疫原性或其他问题或并发症,与合理的获益/风险比相称。例如,Lippincott Williams&Wilkins:宾夕法尼亚州费城,2005;《药物赋形剂手册》(Handbook of Pharmaceutical Excipients),第6版;Rowe等编,药学出版社和美国药学会(The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association):2009:《药物添加剂手册》(Handbook of Pharmaceutical Additives),第3版;Ash和Ash编著,高尔出版公司(Gower Publishing Company):2007;《药物预制剂和制剂》(Pharmaceutical Preformulation and Formulation),第2版,Gibson编,CRC出版有限公司(CRC Press LLC):佛罗里达州博卡拉顿,2009)。在一些实施方式中,药学上可接受的赋形剂对以所用剂量和浓度暴露于的细胞或哺乳动物没有毒性。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是pH缓冲水溶液。

[0131] 在一些实施方式中,附加型是无菌液体,如水和油,包括来自石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内给予组合物(例如药物组合物)时,水是示例性赋形剂。盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油溶液也可用作液体赋形剂,特别适用于注射液。赋形剂还可以包括,淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩(chalk)、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物也可含有少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放制剂等的形式。

[0132] 组合物,包括药物化合物,可以包含结合分子(例如,抗体),例如,其处于分离或纯化的形式,以及合适量的运载体。

[0133] 缩写"MMAE"是指单甲基澳瑞他汀E。

[0134] 除非另有说明,术语"烷基"指包含约1至约20个碳原子(以及其中碳原子的特定数量和范围的所有组合和亚组合)的饱和直链或支链烃,其中约1至约8个碳原子是优选的。烷基的示例是甲基,乙基,正丙基,异丙基,正丁基,异丁基,仲丁基,叔丁基,正戊基,2-戊基,3-戊基,2-甲基-2-丁基,正己基,正庚基,正辛基,正壬基,正癸基,3-甲基-2-丁基,3-甲基-1-丁基,2-甲基-1-丁基,1-己基,2-己基,3-己基,2-甲基-2-戊基,3-甲基-2-戊基,4-甲基-2-戊基,3-甲基-3-戊基,2-甲基-3-戊基,2,3-二甲基-2-丁基和3,3-二甲基-2-丁基。烷基,无论是单独的还是作为另一基团的部分,可以任选地被一个或多个基团取代,优选地1至3个基团(以及选自卤素的任何其它取代基),包括但不限于:-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R',-OC(O)R',-C(O)OR',-C(O)NH_2,-C(O)NHR',-C(O)N(R')$_2$,-NHC(O)R',-SR',-SO_3R',-S(O)$_2$R',-S(O)R',-OH,=O,-N_3,-NH_2,-NH(R'),-N(R')$_2$和-CN,其中各R'独立地选自-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基,并且其中所述-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基和C_2-C_8炔基基团可以任选地被一个或多个基团取代,包括但不限于:-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R",-OC(O)R",-C(O)OR",-C(O)NH_2,-C(O)NHR",-C(O)N(R")$_2$,-NHC(O)R",-SR",-SO_3R",-S(O)

$_2$R”,-S(O)R”,-OH,-N_3,-NH_2,-NH(R”),-N(R”)$_2$和-CN,其中各R”独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或芳基。

[0135] 除非另有说明,术语“烯基”和“炔基”指包含约2至约20个碳原子的直链和支链碳链(以及其中碳原子的特定数量和范围的所有组合和亚组合),其中优选约2至约8个碳原子。烯基链在链中具有至少一个双键,而炔基链在链中具有至少一个三键。烯基的示例包括但不限于:乙烯或乙烯基,烯丙基,-1-丁烯基,-2-丁烯基,-异丁烯基,-1-戊烯基,-2-戊烯基,-3-甲基-1-丁烯基,-2-甲基-2-丁烯基和-2,3-二甲基-2-丁烯基。炔基的示例包括但不限于:乙炔基,炔丙基,乙炔基,丙炔基,-1-丁炔基,-2-丁炔基,-1-戊炔基,-2-戊炔基,和-3-甲基-1丁炔基。烯基和炔基基团,无论是单独的还是作为另一基团的部分,可以任选地被一个或多个基团取代,优选1至3个基团(以及选自卤素的任何其它取代基),包括但不限于:-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R’,-OC(O)R’,-C(O)OR’,-C(O)NH_2,-C(O)NHR’,-C(O)N(R’)$_2$,-NHC(O)R’,-SR’,-SO_3R’,-S(O)$_2$R’,-S(O)R’,-OH,=O,-N_3,-NH_2,-NH(R’),-N(R’)$_2$和-CN,其中各R’独立地选自-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基(alkyenl),-C_2-C_8炔基或-芳基,并且其中所述-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基和-C_2-C_8炔基基团可以任选地被一个或多个取代基取代,包括但不限于:-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2C_8炔基),-芳基,-C(O)R”,-OC(O)R”,-C(O)OR”,-C(O)NH_2,-C(O)NHR”,-C(O)N(R”)$_2$,-NHC(O)R”,-SR”,-SO_3R”,-S(O)$_2$R”,-S(O)R”,-OH,-N_3,-NH_2,-NH(R”),-N(R”)$_2$和-CN,其中各R”独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基。

[0136] 除非另有说明,术语“亚烷基”指包含约1至约20个碳原子(以及其中碳原子的特定数量和范围的所有组合和亚组合)的饱和直链或支链烃基基团,其中约1至约8个碳原子是优选的,并且具有通过从亲本烷烃的相同或两个不同的碳原子去除两个氢原子而衍生的两个单价基团中心。典型的亚烷基包括但不限于:亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、壬基、癸烯、1,4-亚环已基等。烷基,无论是单独的还是作为另一基团的部分,可以任选地被一个或多个基团取代,优选地1至3个基团(以及选自卤素的任何其它取代基),包括但不限于:-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R’,-OC(O)R’,-C(O)OR’,-C(O)NH_2,-C(O)NHR’,-C(O)N(R’)$_2$,-NHC(O)R’,-SR’,-SO_3R’,-S(O)$_2$R’,-S(O)R’,-OH,=O,-N_3,-NH_2,-NH(R’),-N(R’)$_2$和-CN,其中各R’独立地选自-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基,并且其中所述-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基和C_2-C_8炔基基团可以进一步任选地被一个或多个取代基取代,包括但不限于:-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R”,-OC(O)R”,-C(O)OR”,-C(O)NH_2,-C(O)NHR”,-C(O)N(R”)$_2$,-NHC(O)R”,-SR”,-SO_3R”,-S(O)$_2$R”,-S(O)R”,-OH,-N_3,-NH_2,-NH(R”),-N(R”)$_2$和-CN,其中各R”独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C2-C_8炔基或芳基。

[0137] 除非另有说明,否则术语“亚烯基”指含有至少一个碳-碳双键的任选取代的亚烷基。示例性的亚烯基包括例如亚乙烯基(-CH=CH-)和亚丙烯基(-CH=CHCH$_2$-)。

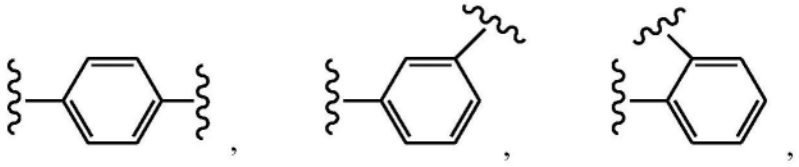
[0138] 除非另有说明,否则术语“亚炔基”指含有至少一个碳-碳三键的任选取代的亚烷基。示例性的亚炔基包括,例如,乙炔(-C≡C-),炔丙基(-CH$_2$C≡C-)和4-戊炔基(-

$CH_2CH_2CH_2C{\equiv}CH$-)。

[0139] 除非另有说明,否则术语"芳基"指通过由亲本芳香族环系统的单个碳源自除去一个氢原子而衍生的具有6-20个碳原子(以及其中碳原子的特定数量和范围的所有组合和亚组合)的单价芳香族烃基基团。某些芳基以示例性的结构"Ar"表示。典型的芳基包括但不限于衍生自苯、经取代的苯、苯基、萘、蒽、联苯基等的基团。

[0140] 芳基,无论是单独的还是作为另一基团的部分,可以任选地被一个或多个,优选1至5个,甚至1至2个基团取代,包括但不限于-卤素,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R',-OC(O)R',-C(O)OR',-C(O)NH_2,-C(O)NHR',-C(O)N(R')$_2$,-NHC(O)R',-SR',-SO_3R',-S(O)$_2$R',-S(O)R',-OH,-NO_2,-N_3,-NH_2,-NH(R'),-N(R')$_2$和-CN,其中各R'独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基,并且其中所述-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基)和-芳基基团进一步任选地被一个或多个取代基取代,包括但不限于:-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R",-OC(O)R",-C(O)OR",-C(O)NH_2,-C(O)NHR",-C(O)N(R")$_2$,-NHC(O)R",-SR",-SO_3R",-S(O)$_2$R",-S(O)R",-OH,-N_3,-NH_2,-NH(R"),-N(R")$_2$和-CN,其中各R"独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基。

[0141] 除非另有说明,否则术语"亚芳基"指任选取代的二价芳基(即通过由亲本芳香族环系统的相同或两个不同碳原子去除两个氢原子而衍生)并且可以为如下述结构所示的邻位、间位或对位构型,其中苯基作为示例性芳基。

[0142] 

[0143] 典型的"-(C_1-C_8亚烷基)芳基"、"-(C_2-C_8亚烯基)芳基"、"和-(C_2-C_8亚炔基)芳基"基团包括但不限于苄基,2-苯基乙烷-1-基,2-苯基乙烯-1-基,萘基甲基,2-萘基乙烷-1-基,2-萘基乙烯-1-基,萘酚苄基,2-萘酚苯基乙烷-1-基等。

[0144] 除非另有说明,术语"杂环"指具有3至14个环原子(也称为环成员)的单环、双环或多环环系统,其中至少一个环中的至少一个环原子是选自N、O、P或S的杂原子(和其中的碳原子和杂原子的范围和特定数目的所有组合和亚组合)。杂环可具有1至4个独立地选自N、O、P或S的环杂原子。杂环中的一个或多个N、C或S原子可被氧化。单环杂环优选具有3至7个环成员(例如,2至6个碳原子和1至3个独立地选自N、O、P或S的杂原子),而双环杂环优选具有5至10个环成员(例如,4至9个碳原子和1至3个独立地选自N、O、P或S的杂原子)。包含杂原子的环可以是芳香族或非芳香族的。除非另有说明,否则杂环在产生稳定结构的任何杂原子或碳原子处与其附属基团相连。杂环述于Paquette,"《现代杂环化学原则》(Principles of Modern Heterocyclic Chemistry)"(W.A.Benjamin,纽约,1968),特别是第1、3、4、6、7和9章;"《杂环化合物的化学,系列专著》(The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A series of Monographs)"(约翰威利父子公司(John Wiley&Sons,Inc.),纽约,1950至今),特别是第13、14、16、19和28卷;和J.Am.Chem.Soc.82:5566(1960)。"杂环"基团的示例包括例如但不限于:吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基(哌啶基)、噻唑基、嘧啶基、呋喃基、噻吩

基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、噻吩基、吲哚基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、吡咯啉基、四氢呋喃基、双-四氢呋喃基、四氢吡喃基、双-四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、偶氮基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻吨基、吡喃基、异苯并呋喃基、色烯基、呫吨基、苯氧噻吩基、2H-吡咯基、异噻唑基、异噻唑基、吡嗪基、哒嗪基、吲哚嗪基、异吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、肉桂基、蝶啶基、4H-咔唑基、咔唑基、β-咔啉基、菲啶基、吖啶基、嘧啶基、菲咯啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、呋喃基、吩噁嗪基、异色满基、色满基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、奎宁环基、吗啉基、噁唑烷基、苯并三唑基、苯并异噁唑基(benzisoxazolyl)、羟吲哚基(oxindolyl)、苯并噁唑啉基(benzoxazolinyl)和靛红酰基(isatinoyl)。优选的“杂环”基团包括但不限于:苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并吡唑基、香豆素基、异喹啉基、吡咯基、噻吩基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基吡啶基、吡啶基、吡嗪基、哒嗪基、异噻唑基、异噁唑基和四唑基。杂环基团,无论是单独的还是作为另一基团的部分,可以任选地被一个或多个基团取代,优选1至2个基团,包括但不限于:-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R',-OC(O)R',-C(O)OR',-C(O)NH_2,-C(O)NHR',-C(O)N(R')$_2$,-NHC(O)R',-SR',-SO_3R',-S(O)$_2$R',-S(O)R',-OH,-N_3,-NH_2,-NH(R'),-N(R')$_2$和-CN,其中各R'独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基,并且其中所示-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基和-芳基基团可以进一步任选地被一个或多个取代基取代,包括但不限于:-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R",-OC(O)R",-C(O)OR",-C(O)NH_2,-C(O)NHR",-C(O)N(R")$_2$,-NHC(O)R",-SR",-SO_3R",-S(O)$_2$R",-S(O)R",-OH,-N_3,-NH_2,-NH(R"),-N(R")$_2$和-CN,其中各R"独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或芳基。

[0145] 出于示例而非限制,碳键合的杂环可以键合在以下位置:吡啶的2、3、4、5或6位;哒嗪的3、4、5或6位;嘧啶的2、4、5或6位;吡嗪的2、3、5或6位;呋喃、四氢呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的2、3、4或5位;噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位;异噁唑、吡唑或异噻唑的3、4或5位;氮杂环丙烷的2或3位;氮杂环丁烷的2、3或4位;喹啉的第2、3、4、5、6、7或8位;或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。更典型地,碳键合的杂环包括:2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、3-哒嗪基、4-哒嗪基、5-哒嗪基、6-哒嗪基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗪基、3-吡嗪基、5-吡嗪基、6-吡嗪基、2-噻唑基、4-噻唑基或5-噻唑基。

[0146] 作为示例而非限制,氮键合的杂环可以键合在氮杂环丙烷、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、二氢吲哚或1H-吲唑的1位;异吲哚或异吲哚啉的2位;吗啉的4位;和咔唑或β-咔啉的9位。更典型地的是,氮键合的杂环包括:1-氮丙啶基(aziridyl),1-氮杂环丁烷基(azetedyl),1-吡咯基,1-咪唑基,1-吡唑基和1-哌啶基。

[0147] 除非另有说明,术语“碳环”指具有3至14个环原子(以及其中碳原子的特定数量和范围的所有组合和亚组合)的饱和或不饱和的非芳香族单环、双环或多环系统,其中所有环原子都是碳原子。单环碳环优选具有3至6个环原子,更优选具有5或6个环原子。双环碳环优

选具有7至12个环原子,例如,排列为双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统,或9或10个环原子排列为双环[5,6]或[6,6]系统。例如,术语"碳环"包括与芳环融合的单环碳环(例如,与苯环融合的单环碳环)。碳环优选具有3至8个碳环原子。碳环基团,无论是单独的还是作为另一基团的部分,可以任选地被例如一个或多个基团,优选1或2个基团(以及选自卤素的任何其它取代基)取代,包括但不限于:-卤素,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R',-OC(O)R',-C(O)OR',-C(O)NH_2,-C(O)NHR',-C(O)N(R')$_2$,-NHC(O)R',-SR',-SO_3R',-S(O)$_2$R',-S(O)R',-OH,=O,-N_3,-NH_2,-NH(R'),-N(R')$_2$和-CN,其中各R'独立地选自:-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基,并且其中所述-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基)和-芳基基团可以进一步任选地被一个或多个取代基取代,包括但不限于:-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基,-卤素,-O-(C_1-C_8烷基),-O-(C_2-C_8烯基),-O-(C_2-C_8炔基),-芳基,-C(O)R",-OC(O)R",-C(O)OR",-C(O)NH_2,-C(O)NHR",-C(O)N(R")$_2$,-NHC(O)R",-SR",-SO_3R",-S(O)$_2$R",-S(O)R",-OH,-N_3,-NH_2,-NH(R"),-N(R")$_2$和-CN,其中各R"是独立地选自-H,-C_1-C_8烷基,-C_2-C_8烯基,-C_2-C_8炔基或-芳基。

[0148] 单环碳环取代基的示例包括:-环丙基、-环丁基、-环戊基、-1-环戊-1-烯基、-1-环戊-2-烯基、-1-环戊-3-烯基、环己基、-1-环己-1-烯基、-1-环己-2-烯基、-1-环己-3-烯基、-环庚基、-环辛基-1,3-环己二烯基、-1,4-环己二烯基、-1,3-环庚二烯基、-1,3,5-环庚三烯基和-环辛二烯基。

[0149] "碳环",无论是单独使用还是作为另一基团的部分使用,指如上定义的为二价的任选取代的碳环基团(即通过从亲本碳环系统相同或两个不同的碳原子去除两个氢原子而衍生)。

[0150] 除非上下文另有说明,连字符(-)表示连接附属分子的点。因此,术语"-(C_1-C_8亚烷基)芳基"或"-C_1-C_8亚烷基(芳基)"指如本文所定义的C_1-C_8亚烷基基团,其中该亚烷基基团连接到亚烷基基团的任何碳原子处的附属分子,并且与亚烷基基团的碳原子键合的氢原子之一被如本文定义的芳基基团取代。

[0151] 当特定基团被"取代"时,该基团可具有一个或多个取代基,优选1到5个取代基,更优选1到3个取代基,最优选1到2个取代基,其独立地选自取代基列表。然而,该基团通常可以具有任意数量的选自卤素的取代基。被取代的基团如此表示。这是旨在使分子中特定位置处的任何取代基或变量的定义独立于其在该分子中别处的定义。可以理解的是,本发明化合物的取代基和取代方式可以由本领域普通技术人员选择,以提供化学上稳定并且可以容易地通过本领域已知技术以及本文下述那些方法容易合成的化合物。

[0152] 本文所用保护基团指选择性地(暂时或永久)封闭多官能化合物中的一个反应位点的基团。用于本发明的合适的羟基保护基团是药学上可接受的,并且在给予对象后可能需要或可能不需要从亲本化合物裂解以使化合物具有活性。裂解是通过体内正常的代谢过程进行的。羟基保护基团为本领域所熟知,参见,T.W.Greene和P.G.M.Wuts的《有机合成中的保护基团》(约翰韦利父子公司,第3版),通过引用以其全部内容纳入本文并用于所有目的,并且其包括,例如、醚(例如,烷基醚和甲硅烷基醚,包括例如二烷基甲硅烷基醚、三烷基甲硅烷基醚、二烷基烷氧基甲硅烷基醚)、酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、磺酸酯和磷酸酯保护基团。羟基保护基团的示例包括但不限于:甲基醚;甲氧基甲基醚、甲硫基甲基醚、(苯基二甲

基甲硅烷基)甲氧基甲基醚、苄氧基甲基醚、对甲氧基苄氧基甲基醚、对硝基苄氧基甲基醚、邻硝基苄氧基甲基醚、(4-甲氧基苯氧基)甲基醚、愈创木酚甲基醚(guaiacolmethyl ether)、叔丁氧基甲基醚、4-戊烯氧基甲基醚、甲硅烷氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基甲基醚、2,2,2-三氯乙氧基甲基醚、双(2-氯乙氧基)甲基醚、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基醚、薄荷氧基甲基醚(menthoxymethyl ether)、四氢吡喃基醚、1-甲氧基环己基醚、4-甲氧基四氢噻喃基醚,4-甲氧基四氢噻喃醚S,S-二氧化物、1-[(2-氯代-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1-(2-氟代苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1-(2-氟代苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氢呋喃基醚、四氢硫代呋喃基醚;经取代的乙醚,如1-乙氧基乙醚、1-(2-氯代乙氧基)乙醚、1-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]乙醚、1-甲基-1-甲氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基-2-氟代乙基醚、1-甲基-1苯氧基乙基醚、2-三甲基甲硅烷基醚、叔丁基醚、烯丙基醚、炔丙基醚、对氯苯基醚、对甲氧基苯基醚、苄基醚、对甲氧基苄基醚3,4-二甲氧基苄基醚、三甲基甲硅烷基醚、三乙基甲硅烷基醚、三丙基甲硅烷基醚、二甲基异丙基甲硅烷基醚、二乙基异丙基甲硅烷基醚、二甲基己基甲硅烷基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚、二苯基甲基甲硅烷基醚、苯甲酰甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯甲氧基乙酸酯,苯乙酸酯、苯甲酸酯、碳酸烷基甲酯、9-芴甲基碳酸烷基酯、碳酸烷基乙酯、碳酸烷基2,2,2,-三氯乙基碳酸酯、1,1,-二甲基-2,2,2-三氯乙基碳酸酯、烷基磺酸盐、甲磺酸盐、苄基磺酸盐、甲苯磺酸盐、亚甲基缩醛、亚乙基缩醛和叔丁基亚甲基缩酮。通过下式表示优选的保护基团:$-R^a$,$-Si(R^a)(R^a)(R^a)$,$-C(O)R^a$,$-C(O)OR^a$,$-C(O)NH(R^a)$,$-S(O)_2R^a$,$-S(O)_2OH$,$P(O)(OH)_2$和$-P(O)(OH)OR^a$,其中R^a是C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基、C_2-C_{20}炔基、$-C_1$-C_{20}亚烷基(碳环)、$-C_2$-C_{20}亚烯基(碳环)、$-C_2$-C_{20}亚炔基(碳环)、$-C_6$-C_{10}芳基、$-C_1$-C_{20}亚烷基(芳基)、$-C_2$-C_{20}亚烯基(芳基)、$-C_2$-C_{20}亚炔基(芳基)、$-C_1$-C_{20}亚烷基(杂环)、$-C_2$-C_{20}亚烯基(杂环)或$-C_2$-C_{20}亚炔基(杂环),其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团无论是单独的还是作为另一基团的部分被任选地取代。

[0153] 如本文所用术语“有效量”或“治疗有效量”指足以产生所需结果的本文所提供的结合分子(例如,抗体)或药物组合物的量。

[0154] 术语“对象”和“患者”可互换使用。如本文所用,在某些实施方式中,对象是哺乳动物,例如非灵长类动物(例如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如,猴和人)。在具体实施方式中,对象是人。在一个实施方式中,对象是诊断患有病症或紊乱的哺乳动物,例如人。在另一个实施方式中,对象是处于发展出病症或紊乱的风险中的哺乳动物,例如,人。

[0155] “给予”或“给药”指注射或以其他方式物理递送存在于体外的物质到患者中,如通过粘膜、皮内、静脉内、肌肉内递送,和/或本文所述或本领域已知的任何其他物理递送方法。

[0156] 如本文所用,术语“治疗”、“处理”和“救治”指因给予一种或多种疗法所致疾病或病症的进展、严重性和/或持续时间的减少或改善。治疗可以通过评估与潜在病症相关的一种或多种症状是否已经减少、缓解和/或减轻从而观察到患者的改善来确定,尽管患者可能仍然患有潜在病症。术语“治疗”包括控制和改善疾病。术语“管理”、“控制”和“管控”指对象由不一定导致疾病治愈的疗法中获得的有益效果。

[0157] 术语“预防”、“防御”和“防治”指减少疾病、紊乱、病症或一种或多种相关症状(例

如,癌症)发作(或复发)的可能性。

[0158] 术语“癌症”或“癌细胞”在本文中用于表示在赘生物中发现的组织或细胞,其具有区别于正常组织或组织细胞的特征。这些特征包括但不限于:发育不全的程度、形状不规则、细胞轮廓不清晰、细胞核大小、细胞核或细胞质结构变化、其他表型变化、存在指示癌变或癌前病变状态的细胞蛋白、有丝分裂数量增加和转移能力。与“癌症”有关的词包括癌、肉瘤、肿瘤、上皮瘤、白血病、淋巴瘤、息肉和卷毛、转化、赘生物等。

[0159] 术语“约”和“大约”意指20%以内、15%以内、10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内或更少的给定值或范围。

[0160] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式,除非上下文中另有明确的说明。

[0161] 应当理解,凡以术语“包含”来描述实施方式的情形中既为同时提供以术语“由……组成/构成”和/或“基本上由……组成/构成”描述的类似实施方式。还应理解,凡以短于“基本上由……组成/构成”来描述实施方式的情形中既为同时提供以术语“由……组成/构成”描述的类似实施方式。

[0162] 在例如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”旨在包括A和B;A或B;A(单独)和B(单独)。类似地,在例如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下实施方式中的每一种:A、B、和C;A、B、或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0163] 5.2药物组合物

[0164] 一方面,本文提供了“药物组合物”,其包括本文提供的抗体药物偶联物和一种或多种药学上可接受的或生理学上可接受的赋形剂。在某些实施方式中,抗体药物偶联物与一种或多种其它试剂组合或分开提供。还提供了一种组合物,其包含这样的一种或多种其它试剂和一种或多种药学上可接受的或生理学上可接受的赋形剂。在具体实施方式中,抗体药物偶联物和一种或多种其它试剂以治疗上可接受的量存在。可以根据本文提供的方法和用途使用药物组合物。因此,例如,药物组合物可以离体或体内给予对象,从而实施本文提供的治疗方法和用途。本文提供的药物组合物可以配制成与预期给药方法或途径相容;示例性的给药途径在本文中阐述。

[0165] 在一些实施方式中,提供了调控癌症或肿瘤的抗体药物偶联物的药物组合物。

[0166] 在一些方面中,药物组合物可进一步包含本文公开的或本领域技术人员已知的其他治疗活性剂或化合物,其可用于治疗或预防如本文所述的各种疾病和病症(例如,癌症)。如上所述,其它治疗活性剂或化合物可以存在于一种或多种单独的药物组合物中。

[0167] 药物组合物通常包含治疗有效量的本文提供的至少一种抗体药物偶联物和一种或多种药学上可接受的制剂试剂。在某些实施方式中,药物组合物进一步包含本文所述的一种或多种其它试剂。

[0168] 在一个实施方式中,药物组合物包含本文提供的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含治疗有效量的本文提供的抗体药物偶联物。在某些实施方式中,药物组合物包含药学上可接受的赋形剂。

[0169] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物选自下文第5.3部分中描述的抗体药物偶联物。

[0170] 在某些实施方式中,药物组合物包含浓度为0.1-100mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为1-20mg/mL的抗体药物偶联物。在其它实施方式中,药物组合物包含浓度为5-15mg/mL的抗体药物偶联物。在其它实施方式中,药物组合物包含浓度为8-12mg/mL的抗体药物偶联物。在其它实施方式中,药物组合物包含浓度为9-11mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约9.5mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约9.6mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约9.7mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约9.8mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约9.9mg/mL的抗体药物偶联物。在其它实施方式中,药物组合物包含浓度为约10mg/mL的抗体药物偶联物。在其它实施方式中,药物组合物包含浓度为约10.1mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约10.2mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约10.3mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约10.3mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约10.4mg/mL的抗体药物偶联物。在一些实施方式中,药物组合物包含浓度为约10.5mg/mL的抗体药物偶联物。

[0171] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物包含:

[0172] L-组氨酸、吐温-20和海藻糖二水合物或蔗糖中的至少一种。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物还包含盐酸(HCl)或琥珀酸。

[0173] 在一些实施方式中,用于本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度范围为5-50mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度范围为10-40mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度范围为15-35mM。

[0174] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度范围为15-30mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度范围为15-25mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度范围为15-35mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约16mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约17mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约18mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约19mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约20mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约21mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约22mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约23mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约24mM。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物中的L-组氨酸的浓度为约25mM。

[0175] 在一些实施方式中,用于本文提供的药物组合物中的吐温-20的浓度范围为0.001-0.1%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.0025-0.075%(v/v)。在一个实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.005-0.05%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.0075-0.025%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.0075-0.05%(v/v)。在其它实施方式中,吐温-20的浓度范围为约0.01-0.03%(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.01%(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20

的浓度为约0.015％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.016％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.017％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.018％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.019％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.02％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.021％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.022％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.023％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.024％(v/v)。在一个具体实施方式中,吐温-20的浓度为约0.025％(v/v)。

[0176] 在一个实施方式中,用于本文提供的药物组合物中的海藻糖二水合物的浓度范围为1％-20％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度范围为约2％-15％(w/v)。在一个实施方式中,海藻糖二水合物的浓度范围为约3％-10％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度范围为约4％-9％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度范围为约4％-8％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度范围为约4％-7％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度范围为约4％-6％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度范围为约4.5％-6％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约4.6％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约4.7％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约4.8％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约4.9％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.0％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.1％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.2％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.3％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.4％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.5％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.6％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.7％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.8％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约5.9％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约6.0％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约6.1％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约6.2％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约6.3％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约6.4％(w/v)。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的浓度为约6.5％(w/v)。

[0177] 在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为50-300mM。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为75-250mM。在一些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为100-200mM。在其它实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为130-150mM。在一些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为135-150mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约135mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约136mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约137mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约138mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约139mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约140mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约141mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约142mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约143mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约144mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约145mM。在某些实施

方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约146mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约150mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约151mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约151mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约152mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约153mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约154mM。在某些实施方式中,海藻糖二水合物的摩尔浓度为约155mM。

[0178] 在一个实施方式中,用于本文提供的药物组合物中的蔗糖的浓度范围为1%-20%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度范围为约2%-15%(w/v)。在一个实施方式中,蔗糖的浓度范围为约3%-10%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度范围为约4%-9%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度范围为约4%-8%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度范围为约4%-7%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度范围为约4%-6%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度范围为约4.5%-6%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约4.6%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约4.7%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约4.8%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约4.9%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.0%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.1%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.2%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.3%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.4%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.5%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.6%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.7%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.8%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约5.9%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约6.0%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约6.1%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约6.2%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约6.3%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约6.4%(w/v)。在其它实施方式中,蔗糖的浓度为约6.5%(w/v)。

[0179] 在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为50-300mM。在其它实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为75-250mM。在一些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为100-200mM。在其它实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为130-150mM。在一些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为135-150mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约135mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约136mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约137mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约138mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约139mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约140mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约141mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约142mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约143mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约144mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约145mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约146mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约150mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约151mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约151mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约152mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约153mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约154mM。在某些实施方式中,蔗糖的摩尔浓度为约155mM。

[0180] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物包含HCl。在其它实施方式中,本文提供的药物组合物包含琥珀酸。

[0181] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH范围为5.5-6.5。在其它实施方式中,本文提供的药物组合物的pH范围为5.7-6.3。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH为约5.7。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH为约5.8。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH为约5.9。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH为约6.0。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH为约6.1。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH为约6.2。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的pH为约6.3。

[0182] 在一些实施方式中,pH取自室温下。在其它实施方式中,pH取自约15℃-27℃下。在其它一些实施方式中,pH取自4℃下。在其它一些实施方式中,pH取自25℃下。

[0183] 在一些实施方式中,pH通过HCl调节。在一些实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为5.5-6.5。在一些实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为5.7-6.3。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为约5.7。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为约5.8。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为约5.9。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为约6.0。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为约6.1。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为约6.2。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在室温下的pH范围为约6.3。

[0184] 在一些实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为5.5-6.5。在一些实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为5.7-6.3。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约5.7。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约5.8。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约5.9。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.0。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.1。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.2。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含HCl,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.3。

[0185] 在一些实施方式中,pH通过琥珀酸调节。在一些实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为5.5-6.5。在一些实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为5.7-6.3。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为约5.7。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为约5.8。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为约5.9。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为约6.0。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为约6.1。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室

温下的pH范围为约6.2。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在室温下的pH范围为约6.3。

[0186] 在一些实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为5.5-6.5。在一些实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为5.7-6.3。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约5.7。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约5.8。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约5.9。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.0。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.1。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.2。在一些更具体的实施方式中,药物组合物包含琥珀酸,并且药物组合物在15℃-27℃下的pH范围为约6.3。

[0187] 在一些具体实施方式中,本文提供的药物组合物包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,和约5.5%(w/v)海藻糖二水合物或约5%(w/v)蔗糖中的至少一种。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物还包含HCl或琥珀酸。在一些实施方式中,pH在室温下为约6.0。在一些实施方式中,pH在25℃下为约6.0。

[0188] 在一些具体实施方式中,本文所提供的药物组合物包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约5.5%(w/v)海藻糖二水合物和HCl。在一些实施方式中,pH在室温下为约6.0。在一些实施方式中,pH在25℃下为约6.0。

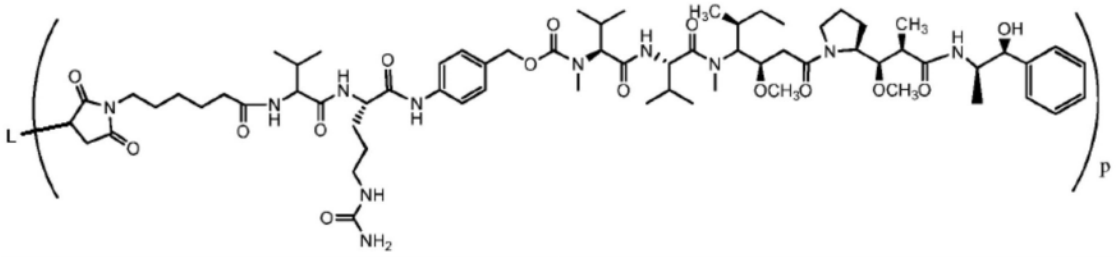
[0189] 在一些具体实施方式中,本文所提供的药物组合物包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约5%(w/v)蔗糖和HCl。在一些实施方式中,pH在室温下为约6.0。在一些实施方式中,pH在25℃下为约6.0。

[0190] 在其它具体实施方式中,本文所提供的药物组合物包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约5.5%(w/v)海藻糖二水合物和琥珀酸。在一些实施方式中,pH在室温下为约6.0。在一些实施方式中,pH在25℃下为约6.0。

[0191] 在一些具体实施方式中,本文所提供的药物组合物包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约5%(w/v)蔗糖和琥珀酸。在一些实施方式中,pH在室温下为约6.0。在一些实施方式中,pH在25℃下为约6.0。

[0192] 在具体实施方式中,本文提供的包含:

[0193] (a)包含下述结构的抗体药物偶联物:

[0194] 

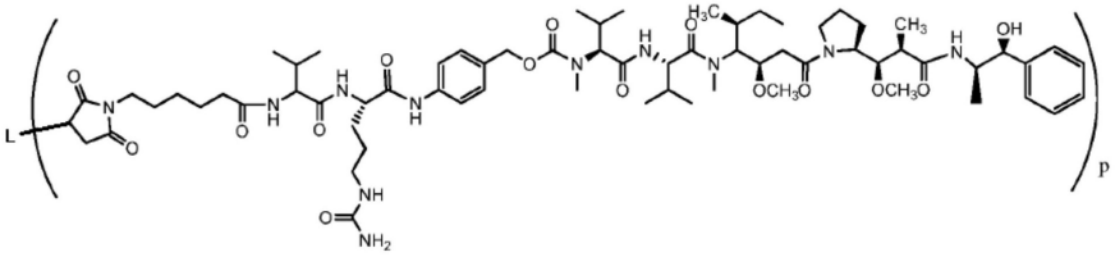
[0195] 其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10;和

[0196] (b)药学上可接受的赋形剂,其包含约20mM L-组氨酸,约0.02%(w/v)吐温-20,约

5.5％(w/v)海藻糖二水合物和HCl,其中抗体药物偶联物的浓度为约10mg/mL,并且其中pH在25℃下为约6.0。

[0197] 在另一具体实施方式中,本文提供的药物组合物包含:

[0198] (a)包含下述结构的抗体药物偶联物:

[0199] 

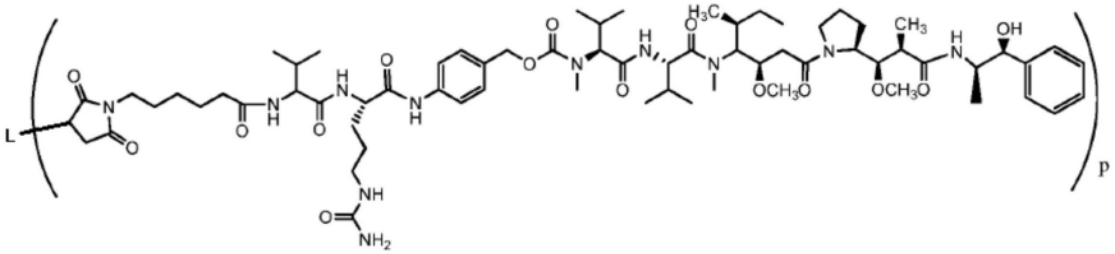
[0200] 其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10;和

[0201] (b)药学上可接受的赋形剂,其包含约20mM L-组氨酸,约0.02％(w/v)吐温-20,约5.5％(w/v)海藻糖二水合物和琥珀酸,

[0202] 其中抗体药物偶联物的浓度为约10mg/mL,并且其中pH在25℃下为约6.0。

[0203] 在另一具体实施方式中,本文提供的药物组合物包含:

[0204] (a)包含下述结构的抗体药物偶联物:

[0205] 

[0206] 其中L-代表抗体或其抗原结合片段,并且p是1-10;和

[0207] (b)药学上可接受的赋形剂,其包含约20mM L-组氨酸,约0.02％(w/v)吐温-20,约5.0％(w/v)蔗糖和HCl,

[0208] 其中抗体药物偶联物的浓度为约10mg/mL,并且其中pH在25℃下为约6.0。

[0209] 虽然提供了某些数字(及其数值范围),但应理解的是,在某些实施方式中,所述数字(或数值范围)内,例如,2％、5％、10％、15％或20％的数值也被考虑在内。下述实验部分中提供了其他示例性的药物组合物。

[0210] 载剂中的主要溶剂本质上可以是水性的或非水性的。此外,载剂可以含有其他药学上可接受的赋形剂,用于改变或维持药物组合物的pH、渗透压、粘度、无菌性或稳定性。在某些实施方式中,药学上可接受的载剂是水性缓冲液。在其他实施方式中,载剂包括例如氯化钠和/或柠檬酸钠。

[0211] 本文提供的药物组合物还可以包含其他药学上可接受的制剂,用于改变或维持抗体药物偶联物和/或其它试剂的释放速率,如本文所述。这类制剂包括在制备缓释制剂为本领域技术人员已知的物质。关于药学上和生理学上可接受的制剂的进一步参考,参见例如,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版(1990,宾夕法尼亚州伊斯顿的麦克出版公司(Mack Publishing Co.)18042)第1435-1712页,《默克索引》(The Merck Index),第12版(1996,新泽西州怀特豪斯的默克出版集团公司(Merck Publishing

Group));和《固体剂型的药学原理》(Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms)(1993,宾夕法尼亚州兰卡斯特的泰克尼克出版有限公司(Technonic Publishing Co.,Inc.))。适用于给药的其他药物组合物是本领域已知的并且适用于本文提供的方法和组合物。

[0212] 一些实施方式中,本文提供的药物组合物呈液体形式。在其它实施方式中,本文提供的药物组合物是冻干的。

[0213] 药物组合物可以溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或二水合或冻干粉末储存在无菌小瓶中。这类组合物可以即用形式、使用前需要重建的冻干形式、使用前需要稀释的液体形式或其他可接受的形式储存。在一些实施方式中,药物组合物在一次性容器(例如,一次性小瓶、安瓿、注射器或自动注射器(类似于,例如,EpiPen®))中提供,然而在其它实施方式中提供了多次使用容器(例如在多次使用小瓶)。任何药物递送装置都可以用于递送本文所述的肽和其他药剂,包括植入物(例如,可植入泵)和导管系统,这两者都是本领域技术人员已知的。通常皮下或肌肉内给予的贮库(depot)注射也可用于在限定的时间段内释放本文所述的肽和/或其他药剂。贮库注射通常是基于固体或基于油的,并且通常包含本文所述的至少一种制剂组分。本领域技术人员熟悉贮库注射可能的制剂和用途。在某些实施方式中,考虑使用Nano Precision Medical的贮库递送技术(Nano Precision Medical;加利福尼亚州的埃默里维尔)。该技术利用产生大分子的零级释放率的二氧化钛纳米管膜,例如蛋白质和肽治疗剂。生物相容性膜容纳安置于小型皮下植入物中,该植入物提供治疗性大分子的长期(例如,长达一年)、恒定速率递送。

[0214] 可以将药物组合物配制成与其预定的给药途径相容。因此,药物组合物包括适合通过包括肠胃外(例如,皮下(s.c.)、静脉内、肌肉内或腹膜内)、皮内、口服(例如,摄入)、吸入、腔内、颅内和经皮(局部)的途径给药的赋形剂。其他示例性给药途径在本文中示出。

[0215] 药物组合物可以是无菌可注射水性或油性悬浮液的形式。可以使用本文公开的或本领域技术人员已知的合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制该悬浮液。无菌注射制剂也可以是配制在无毒的肠胃外可接受稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如配制在1,3-丁二醇中的溶液剂。可以采用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括:水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、Cremophor EL™(巴斯夫公司(BASF),新泽西州的帕西帕尼)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇),和其合适的混合物。此外,常将无菌的非挥发油用作溶剂或悬浮介质。为此,可采用各种低刺激非挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,注射剂的制备中还用到脂肪酸如油酸。通过包括延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶),可以实现特定可注射制剂的延长吸收。

[0216] 在一个实施方式中,本文提供的药物组合物可以通过注射、输注或植入来肠胃外给予,用于局部或全身给药。如本文所用,肠胃外给药包括静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌肉内、滑膜内和皮下给药。

[0217] 在一个实施方式中,本文提供的药物组合物可以配制成适合肠胃外给药的任何剂型,包括溶液、混悬液、乳剂、胶束、脂质体、微球、纳米系统和适用于注射前液体中的溶液或悬浮物的固体形式。这类剂型可根据药物科学技术领域技术人员已知的常规方法制备(参见例如,雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),引用如上)。

[0218] 在一个实施方式中,旨在用于肠胃外给药的药物组合物可以包括一种或多种药学上可接受的赋形剂,包括但不限于,水性载剂,水混溶性载剂,非水性载剂,抗微生物生长的防腐剂或抗微生物剂,稳定剂、溶解度增强剂,等渗剂,缓冲剂,抗氧化剂,局部麻醉剂,悬浮剂和分散剂,润湿剂或乳化剂,复合剂,掩蔽剂或螯合剂,冷冻保护剂,冻干保护剂,增稠剂,pH调节剂和惰性气体。

[0219] 在一个实施方式中,合适的水性载剂包括但不限于:水、盐水、生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、氯化钠注射液、林格注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖和乳酸林格注射液。非水性载剂包括但不限于植物来源的固定油,蓖麻油,玉米油,棉籽油,橄榄油,花生油,薄荷油,红花油,芝麻油,大豆油,氢化植物油,氢化大豆油、椰子油中链甘油三酯和棕榈籽油。水混溶性载剂包括但不限于:乙醇,1,3-丁二醇,液体聚乙二醇(例如,聚乙二醇300和聚乙二醇400)、丙二醇、甘油、N-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基乙酰胺和二甲基亚砜。

[0220] 在一个实施方式中,合适的抗微生物剂或防腐剂包括但不限于:苯酚、甲酚、汞、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵(例如,苄索氯铵)、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯和山梨酸。合适的等渗剂包括但不限于:氯化钠、甘油和葡萄糖。合适的缓冲剂包括但不限于磷酸盐和柠檬酸盐。合适的抗氧化剂是如本文所述的那些,包括亚硫酸氢盐和焦亚硫酸钠。合适的局部麻醉剂包括但不限于盐酸普鲁卡因。合适的悬浮剂和分散剂是如本文所述的那些,包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。合适的乳化剂包括本文所述的那些,包括聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯80和油酸三乙醇胺。合适的掩蔽剂或螯合剂包括但不限于EDTA。合适的pH调节剂包括但不限于:氢氧化钠、盐酸、柠檬酸和乳酸。合适的复合剂包括但不限于:环糊精,包括α-环糊精,β-环糊精,羟丙基-β-环糊精,磺丁基醚-β-环糊精和磺基丁基醚7-β-环糊精(CAPTISOL®、CyDex、Lenexa、KS)

[0221] 在一个实施方式中,本文提供的药物组合物可以配制用于单剂量或多剂量给药。单剂量制剂包装在安瓿、小瓶或注射器中。多剂量肠胃外制剂可包含抑菌或抑真菌浓度的抗微生物剂。如本领域已知和实践,所有肠胃外制剂必须是无菌的。

[0222] 在一个实施方式中,药物组合物作为即用型无菌溶液提供。在另一个实施方式中,药物组合物作为无菌干燥可溶性产品提供,包括冻干粉末剂和皮下注射片剂,在使用前经载剂重建。在另一个实施方式中,药物组合物作为即用型无菌悬浮液提供。在另一个实施方式中,药物组合物作为无菌干燥不溶性产品提供,在使用前经载剂重建。在另一个实施方式中,药物组合物作为即用型无菌乳剂提供。

[0223] 在一个实施方式中,本文提供的药物组合物可以配制成即用或改良释放剂型,包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序化释放形式。

[0224] 在一个实施方式中,药物组合物可以配制成悬浮液、固体、半固体或触变液体,用于作为植入的贮库给药。在一个实施方式中,本文提供的药物组合物分散在固体内基质中,其被外聚合物膜包围,所述外聚合物膜不溶于体液但允许药物组合物中的活性成分扩散通过。

[0225] 在一个实施方式中,合适的内部基质包括:聚甲基丙烯酸甲酯,聚甲基丙烯酸丁酯,增塑或未增塑的聚氯乙烯,增塑尼龙,增塑的聚对苯二甲酸乙二醇酯,天然橡胶,聚异戊

二烯,聚异丁烯,聚丁二烯,聚乙烯,乙烯-乙酸乙烯酯共聚物,硅橡胶,聚二甲基硅氧烷,有机硅碳酸酯共聚物,亲水性聚合物,例如丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的水凝胶,胶原蛋白,交联的聚乙烯醇和交联的部分水解聚乙酸乙烯酯。

[0226] 在一个实施方式中,合适的外聚合物膜包括:聚乙烯、聚丙烯、乙烯/丙烯共聚物、乙烯/丙烯酸乙酯共聚物、乙烯/乙酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、氯丁橡胶、氯化聚乙烯、聚氯乙烯、氯乙烯共聚物与乙酸乙烯酯、偏二氯乙烯、乙烯和丙烯、离聚物聚对苯二甲酸乙二醇酯、丁基橡胶环氧氯丙烷橡胶、乙烯/乙烯醇共聚物、乙烯/乙烯氧乙醇共聚物和乙烯/乙酸乙烯酯/乙烯醇三元共聚物。

[0227] 水性悬浮液含有与适合其制造的赋形剂混合的活性材料。此赋形剂是悬浮剂,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯基吡咯烷酮、黄芪树胶和阿拉伯胶;分散剂或湿润剂可以是天然产生的磷脂(如卵磷脂),或环氧烷与脂肪酸的缩合产物(如聚氧乙烯硬脂酸酯),或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(如十七烷基乙烯氧基十六烷醇(heptadecaethyleneoxycetanol)),或者环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯),或者环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(如聚乙烯山梨聚糖单油酸酯)。水性悬浮液还可含有一种或多种防腐剂。

[0228] 油性悬浮液可通过将活性成分悬浮于植物油(例如,花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或例如液体石蜡的矿物油中来制备。含油悬浮液可含有增稠剂,如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可加入甜味剂(例如,如上所述的那些)和调味剂,以提供可口的口服制剂。

[0229] 适用于通过加水制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒提供活性成分,其与分散剂或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合。合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂的例子在本文进行列举。

[0230] 本文提供的药物组合物也可以是水包油乳剂的形式。油相可以是植物油(如橄榄油或落花生油),或者是矿物油(如液体石蜡),或者是它们的混合物。合适的乳化剂可以是天然产生的树胶,如阿拉伯胶或黄芪树胶;天然产生的磷脂,如大豆、卵磷脂;以及脂肪酸和己糖醇酐产生的酯或偏酯,例如山梨聚糖单油酸酯;以及偏酯与环氧乙烷的缩合产物,如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯。

[0231] 药物组合物可以还包含赋形剂,以保护化合物不被身体快速降解或清除,例如控释配方,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微囊化递送系统。例如,可以单独使用延时材料,例如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯,或与蜡组合使用。通过包括延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶),可以实现可注射药物组合物的延长吸收。也可通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)实现防止微生物的作用。

[0232] 本文所提供的药物组合物储存于-80℃、4℃、25℃或37℃。

[0233] 冻干组合物可以通过冷冻干燥本文提供的液体药物组合物来制备。在具体实施方式中,此处提供的药物组合物是冻干的药物组合物。在一些实施方式中,药物制剂是冻干粉末,其可以被重建以溶液,乳液和其它混合物的形式给药。它们也可以被重建并配制成固体或凝胶。

[0234] 在一些实施方式中,本文提供的冻干制剂的制备涉及配制用于冻干的大量溶液,

无菌过滤,填充小瓶,在冻干室中冷冻小瓶,然后冻干、加塞和加盖。

[0235] 冻干剂可用于制备冻干制剂。例如,可以采用VirTis Genesis Model EL试验单元。该装置纳入带有三个工作架的室(总可用架面积约为0.4平方米)、外部冷凝器和机械真空泵系统。级联机械制冷允许将架冷却至-70℃或更低,并将外部冷凝器冷却至-90℃或更低。支架温度和室压力分别自动控制为+/-0.5℃和+/-2微米(毫托)。该装置配备有电容式压力计真空计,皮拉尼真空计,压力传感器(测量从0到1个大气压)和相对湿度传感器。

[0236] 通过将本文提供的抗体药物偶联物或其药学上可接受的衍生物溶解在合适的溶剂中可以制备冻干粉末。在一些实施方式中,冻干粉末是无菌的。所需的制剂由依次无菌过滤溶液随后在本领域技术人员已知的标准条件下冻干而提供。在一个实施方式中,所得溶液将分配到小瓶中用于冻干。各小瓶将包含单剂量或多剂量的抗体药物偶联物。冻干粉末可在适当条件下储存,如在约4℃至室温下。

[0237] 用注射用水重建该冻干粉末可提供用于肠胃外给药的制剂。为了重建,将冻干粉末添加到无菌水或其他合适的赋形剂中。该量可根据具体需要凭经验确定和调整。

[0238] 示例性的重建程序说明如下:(1)将具有18或20号针头的5mL或3mL注射器安装并用注射用水(WFI)级的水填充注射器;(2)用注射器刻度测量适量的注射用水,确保注射器没有气泡;(3)将针头穿过橡皮塞;(4)将注射器的全部内容物沿小瓶壁向下分配到容器中,取出注射器和针头并放入锋利的容器中;(4)连续摇动小瓶以小心地溶解整个小瓶内容物直到完全重建(例如,大约20-40秒),并尽量减少可能导致起泡的蛋白质溶液的过度搅拌。

[0239] 5.3抗191P4D12抗体药物偶联物

[0240] 本文提供的药物组合物、制剂和剂型包含抗191P4D12抗体药物偶联物。本文提供的抗191P4D12抗体药物偶联物包含偶联至一个或多个细胞毒剂单元(或药物单元)的结合191P4D12的抗体或其抗原结合片段。细胞毒性剂(或药物单元)可以直接或通过接头单元(LU)共价连接。

[0241] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物化合物或其药学上可接受的盐或容积化物具有下述结构:

[0242] $L-(LU-D)_p$ (I)

[0243] 其中:

[0244] L是抗体单元,例如,如下文第5.3.1部分中提供的抗191P4D12抗体或其抗原结合片段,和

[0245] (LU-D)是接头单元-药物单元部分,其中:

[0246] LU-是一个连接单元,和

[0247] D是对靶细胞具有细胞抑制性或细胞毒活性的药物单元;和

[0248] p是1-20的整数。

[0249] 在一些实施方式中,p的范围为1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3或1-2。在一些实施方式中,p的范围为2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4或2-3。在其他实施方式中,p约为1。在其他实施方式中,p约为2。在其他实施方式中,p约为3。在其他实施方式中,p约为4。在其他实施方式中,p约为5。在其他实施方式中,p约为6。在其他实施方式中,p约为7。在其他实施方式中,p约为8。在其他实施方式中,p约为9。在其他实施方式中,p约为10。

[0250] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物化合物或其药学上可接受的盐或容积化物具

有下述结构：

[0251] $L-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$ (II)

[0252] 其中：

[0253] L是抗体单元,例如,如下文第5.3.1部分中提供的抗191P4D12抗体或其抗原结合片段,和

[0254] $-A_a-W_w-Y_y-$是接头单元(LU),其中：

[0255] -A-是延伸体单元,

[0256] a是0或1,

[0257] 各-W-独立地为氨基酸单元,

[0258] w是0-12的整数,

[0259] -Y-是自毁型(self-immolative)间隔单元,

[0260] y是0、1或2;

[0261] D是对靶细胞具有细胞抑制性或细胞毒活性的药物单元;和

[0262] p是1-20的整数。

[0263] 在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,和y是0、1或2。在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,和y是0或1。在一些实施方式中,p的范围为1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3或1-2。在一些实施方式中,p的范围为2-8、2-7、2-6、2-5、2-4或2-3。在其他实施方式中,p是1、2、3、4、5或6。在一些实施方式中,p是2或4。在一些实施方式中,当w不是零时,y是1或2。在一些实施方式中,当w是1-12时,y是1或2。在一些实施方式中,w是2-12,和y是1或2。在一些实施方式中,a是1,和w和y是0。

[0264] 对于包含多种抗体或其抗原结合片段的组合物,药物加载由p表示,即药物分子的平均数/抗体单元。各抗体的药物加载的范围为1-20个药物(D)。制备偶联反应中各抗体的平均药物数可以通过常规方法表征,例如质谱、ELISA试验和HPLC。还可以确定抗体药物偶联物在p方面的定量分布。在一些情况中,可以通过诸如反相HPLC或电泳之类的方法实现对同质抗体药物偶联物的分离、纯化和表征,其中p是来自具有其他药物加载的抗体药物偶联物的特定值。在一些实施方式中,p是2-8。

[0265] 5.3.1抗191P4D12抗体或抗原结合片段

[0266] 在一个实施方式中,结合191P4D12相关蛋白的抗体或抗原结合片段是特异性结合包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的191P4D12蛋白(参见图5A)。编码191P4D12蛋白的相应cDNA具有序列SEQ ID NO:1(参图5A)。

[0267] 特异性结合包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的191P4D12蛋白的抗体包括可以结合其它相关191P4D12蛋白的抗体。例如,结合包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的191P4D12蛋白的抗体可以结合191P4D12相关蛋白,如191P4D12变体及其同源物或类似物。

[0268] 在一些实施方式中,本文提供抗191P4D12抗体是单克隆抗体。

[0269] 在一些实施方式中,抗体包含重链和/或轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(SEQ ID NO:3的cDNA序列),所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:6(SEQ ID NO:5的cDNA序列),如图5B所示。

[0270] 在一些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含这样的互补决定区(CDR),其包含SEQ ID NO:7中所示重链可变

区的CDR的氨基酸序列,所述轻链可变区包含这样的CDR,其包含SEQ ID NO:8中所示轻链可变区的CDR的氨基酸序列。SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8如图5所示并列于下文:

[0271] SEQ ID NO:7

[0272] MELGLCWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0273] SEQ ID NO:8

[0274] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0275] 在一些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:22中所示重链可变区的氨基酸序列(其是SEQ ID NO:7从第20个氨基酸(谷氨酸)到第136个氨基酸(丝氨酸)的氨基酸序列),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:23中所示轻链可变区的氨基酸序列(其是SEQ ID NO:8从第23个氨基酸(天冬氨酸)到第130个氨基酸(精氨酸)的氨基酸序列)。在其它实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由SEQ ID NO:22中所示重链可变区的氨基酸序列(其是SEQ ID NO:7从第20个氨基酸(谷氨酸)到第136个氨基酸(丝氨酸)的氨基酸序列)组成,所述轻链可变区由SEQ ID NO:23中所示轻链可变区的氨基酸序列(其是SEQ ID NO:8从第23个氨基酸(天冬氨酸)到第130个氨基酸(精氨酸)的氨基酸序列)组成。以下将SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23列出:

[0276] SEQ ID NO:22

[0277] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSS

[0278] SEQ ID NO:23

[0279] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKR

[0280] CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。如上所述,CDR区是本领域技术人员众所周知的并且已经由众所周知的编号系统定义。例如,Kabat互补决定区(CDR)基于序列变异性并且是最常用的(参见例如,Kabat等,同上)。Chothia指的则是结构环的位置(参见例如,Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.196:901-17)。取决于环的长度,当使用Kabat编号方法时,Chothia CDR-H1环的末端在H32和H34之间变化(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,那么环在32结束;如果仅存在35A,那么环在33结束;如果同时存在35A和35B,那么环在34结束)。AbM超变区表示Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,并且被牛津分子科技公司(Oxford Molecular)的AbM抗体建模软件所使用(参见

例如,《抗体工程改造》(Antibody Engineering)第2卷(Kontermann和Dübel编著,第2版2010))。“Contact”超变区基于可变复合物晶体结构的分析。已经开发并广泛采用了另一通用编号系统ImMunoGeneTics(IMGT)InformationSystem® (Lafranc等,2003,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77)。IMGT是专供人类和其他脊椎动物的免疫球蛋(IG)、T细胞受体(TCR)和主要组织相容复合物(MHC)的整合信息系统。因此,就氨基酸序列和轻链或重链内的位置表示CDR。由于免疫球蛋白可变域结构内CDR的“位置”在物种之间是保守的并且存在于称为环的结构中,因此通过使用根据结构特征比对可变域序列的编号系统,很容易识别CDR和框架残基。该信息可以用于移植或替换来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基到受体框架,其通常来自人抗体。Honegger和Plückthun,2001,J.Mol.Biol.309:657-70已经开发了额外的编号系统(AHon)。编号系统包括,例如,Kabat编号和IMGT独特编号系统,之间的对应关系为本领域技术人员所熟知(参见例如,Kabat,引用如上;Chothia和Lesk,引用如上;Martin,引用如上;Lefranc等,引用如上)。来自这些高变区或CDR各自的残基在上述表30中注释。

[0281] 在一些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含这样的互补决定区(CDR),其包含根据Kabat编号的SEQ ID NO:7中所示重链可变区的CDR的氨基酸序列,所述轻链可变区包含这样的CDR,其包含根据Kabat编号的SEQ ID NO:8中所示轻链可变区的CDR的氨基酸序列。

[0282] 在一些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含这样的互补决定区(CDR),其包含根据AbM编号的SEQ ID NO:7中所示重链可变区的CDR的氨基酸序列,所述轻链可变区包含这样的CDR,其包含根据AbM编号的SEQ ID NO:8中所示轻链可变区的CDR的氨基酸序列。

[0283] 在一些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含这样的互补决定区(CDR),其包含根据Chothia编号的SEQ ID NO:7中所示重链可变区的CDR的氨基酸序列,所述轻链可变区包含这样的CDR,其包含根据Chothia编号的SEQ ID NO:8中所示轻链可变区的CDR的氨基酸序列。

[0284] 在一些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含这样的互补决定区(CDR),其包含根据Contact编号的SEQ ID NO:7中所示重链可变区的CDR的氨基酸序列,所述轻链可变区包含这样的CDR,其包含根据Contact编号的SEQ ID NO:8中所示轻链可变区的CDR的氨基酸序列。

[0285] 在一些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含这样的互补决定区(CDR),其包含根据IMGT编号的SEQ ID NO:7中所示重链可变区的CDR的氨基酸序列,所述轻链可变区包含这样的CDR,其包含根据IMGT编号的SEQ ID NO:8中所示轻链可变区的CDR的氨基酸序列。

[0286] 如上所述,可以容易地确定根据不同编号系统的CDR序列,例如,使用在线工具,如由抗原受体编号和受体分类(Antigen receptor Numbering And Receptor ClassificatIon,ANARCI)提供的工具。例如,由ANARCI确定的根据Kabat编号的SEQ ID NO:7内的重链CDR序列和SEQ ID NO:8内的轻链CDR序列列于下表31中。

[0287] 表31

[0288]

	SEQ ID NO:7的VH	SEQ ID NO:8的VL
CDR1	SYNMN(SEQ ID NO:9)	RASQGISGWLA(SEQ ID NO:12)
CDR2	YISSSSSTIYYADSVKG(SEQ ID NO:10)	AASTLQS(SEQ ID NO:13)
CDR3	AYYYGMDV(SEQ ID NO:11)	QQANSFPPT(SEQ ID NO:14)

[0289] 又例如,由ANARCI确定的根据IMGT编号的SEQ ID NO:22内的重链CDR序列和SEQ ID NO:23内的轻链CDR序列列于下表32中。

[0290] 表32

[0291]

	SEQ ID NO:7的VH	SEQ ID NO:8的VL
CDR1	GFTFSSYN(SEQ ID NO:16)	QGISGW(SEQ ID NO:19)
CDR2	ISSSSSTI(SEQ ID NO:17)	AAS(SEQ ID NO:20)
CDR3	ARAYYYGMDV(SEQ ID NO:18)	QQANSFPPT(SEQ ID NO:21)

[0292] 在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包括:含有氨基酸序列SEQ ID NO:9的CDR H1,含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的CDR H2,含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的CDR H3;含有氨基酸序列SEQ ID NO:12的CDR L1,含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的CDR L2,和含有氨基酸序列SEQ ID NO:14的CDR L3。

[0293] 在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含从SEQ ID NO:7第20个氨基酸(谷氨酸)到第136个氨基酸(丝氨酸)范围的氨基酸序列,而所述轻链可变区包含从SEQ ID NO:8第23个氨基酸(天冬氨酸)到第130个氨基酸(精氨酸)范围的氨基酸序列。

[0294] 在一些实施方式中,所述抗体包括重链和轻链,所述重链包含从SEQ ID NO:7第20个氨基酸(谷氨酸)到第466个氨基酸(赖氨酸)范围的氨基酸序列,而所述轻链包含从SEQ ID NO:8第23个氨基酸(天冬氨酸)到第236个氨基酸(半胱氨酸)范围的氨基酸序列。

[0295] 在一些实施方式中,考虑了本文所述抗体的一种或多种氨基酸序列修饰。例如,可能需要优化抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性,包括但不限于,特异性,热稳定性,表达水平,效应物功能,糖基化,免疫原性降低或溶解性。因此,除了本文所述的抗体,考虑了可以制备抗体变体。例如,抗体变体可以通过将合适的核苷酸改变导入编码DNA和/或通过合成所需抗体或多肽制备。本领域技术人员将理解的是,氨基酸改变可能改变抗体的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数量或位置或者改变膜锚定特征。

[0296] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体经化学修饰,例如,通过共价连接任何类型的分子与抗体。抗体衍生物可以包括,已经化学修饰的抗体,例如,通过糖基化、乙酰化、PEG化、磷酸化、酰胺化、由已知保护/阻断基团衍生、蛋白水解裂解、连接于细胞配体或其它蛋白质等。通过已知技术可进行多种化学修饰中的任一种,包括但不限于:特异性化学裂解、乙酰化、制剂、衣霉素的代谢合成等。此外,抗体可以包含一种或多种非经典氨基酸。

[0297] 变异可以是一个或多个编码单域抗体或多肽的密码子的取代、缺失或插入,其导致氨基酸序列相较于原始抗体或多肽发生变化。氨基酸取代可以是用包含相似结构和/或化学特性的一种氨基酸替换另一氨基酸的结果,诸如用丝氨酸置换亮氨酸,例如,保守性氨基酸替换。本领域技术人员已知的标准技术可用于在编码本文提供的分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如导致氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。插入或缺失可任选地在约1-5个氨基酸的范围内。在某些实施方式中,取代、缺失或插入包括相对于原始分子少于

25个氨基酸取代,少于20个氨基酸取代,少于15个氨基酸取代,少于10个氨基酸取代,少于5个氨基酸取代,少于4个氨基酸取代,少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在具体实施方式中,取代是位于一个或多个预测的非必须氨基酸残基处的保守性氨基酸取代。允许的变异可以通过在序列中系统地进行氨基酸的插入、缺失或替换并测试所得变体的亲本抗体表现出的活性来确定。

[0298] 氨基酸序列插入包括长度范围从一个残基到包含多个残基的多肽的氨基-和/或羧基-末端融合体,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的示例包括具有N-末端甲硫氨酰残基的抗体。

[0299] 通过保守氨基酸取代产生的抗体包括在本公开中。在保守氨基酸置换中,氨基酸残基被包含具有相似电荷的侧链的氨基酸残基替换。如上所述,本领域已定义具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括:具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者,也可沿编码序列的全部或部分随机引入突变(例如通过饱和诱变),然后可筛选所得突变体的生物学活性,以鉴定保持活性的突变体。诱变后,可以表达所编码的蛋白质并且可以确定蛋白质的活性,可以进行保守的(例如,在具有相似特性和/或侧链的氨基酸组内)取代,以保持或不显著地改变特性。

[0300] 氨基酸可以根据其侧链性质中的相似性分组(参见例如,Lehninger,《生物化学》(Biochemistry)73-75(第2版1975)):(1)非极性Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M);(2)不带电荷的极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q);(3)酸性:Asp(D)、Glu(E);和(4)碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。或者,天然产生的残基可以基于共同的侧链特性分组:(1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;和(6)芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0301] 例如,也可对不涉及保持抗体适当构象的任何半胱氨酸残基进行取代,例如,用另一氨基酸,如丙氨酸或丝氨酸以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。

[0302] 改变可采用本领域已知的方法进行,例如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描以及PCR诱变。定点诱变(参见例如,Carter,1986,Biochem J.237:1-7;和Zoller等,1982,Nucl.Acids Res.10:6487-500),盒式诱变(参见例如,Wells等,1985,Gene 34:315-23),或其他已知的技术可以在克隆的DNA上进行,以产生抗-抗MSLN抗体变体DNA。

[0303] 抗体的共价修饰包括在本发明范围内。共价修饰包括使抗体的靶向氨基酸残基与有机衍生剂反应,所述有机衍生剂能够与抗体选定的侧链或N-或C-末端残基反应。其他修饰包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺成相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰或苏氨酸残基的羟基磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的α-氨基甲基化(参见例如,Creighton,《蛋白质结构和分子特性》(Proteins:Structure and Molecular Properties)79-86(1983)),N-末端胺的乙酰化和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0304] 本公开范围内包括的抗体的共价修饰的其他类型包括,改变抗体或多肽的天然糖基化模式(参见例如,Beck等,2008,Curr.Pharm.Biotechnol.9:482-501;和Walsh,2010,Drug Discov.Today 15:773-80),和连接抗体与各种非蛋白性(nonproteinaceous)聚合物中的一种,例如,聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧烷基,以例如,美国专利号4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192;或4,179,337中所述方式。

[0305] 在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:NO:7中所示重链具有超过70%同源性的重链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:7中所示重链具有超过75%同源性的重链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:7中所示重链具有超过80%同源性的重链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:7中所示重链具有超过85%同源性的重链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:7中所示重链具有超过90%同源性的重链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:7中所示重链具有超过95%同源性的重链。

[0306] 在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:8中所示轻链具有超过70%同源性的轻链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:8中所示轻链具有超过75%同源性的轻链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:8中所示轻链具有超过80%同源性的轻链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:8中所示轻链具有超过85%同源性的轻链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:8中所示轻链具有超过90%同源性的轻链。在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:8中所示轻链具有超过95%同源性的轻链。

[0307] 在一些实施方式中,本文提供的抗191P4D12抗体包含由杂交瘤产生的名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的重链和轻链CDR区,所述杂交瘤以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏,或者包含这样的氨基酸序列的重链和轻链CDR区,所述氨基酸序列与Ha22-2(2,4)6.1的重链和轻链CDR区氨基酸序列具有同源性,并且其中抗体保留了以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的名为Ha22-2(2,4)6.1的抗191P4D12抗体所需的功能特性。

[0308] 在一些实施方式中,本文提供的抗体或其抗原结合片段包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中:

[0309] (a)重链可变区包含这样的CDR,所述CDR包含以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体中所示重链可变区CDR的氨基酸序列;

[0310] (b)轻链可变区包含这样的CDR,所述CDR包含以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体中所示轻链可变区CDR的氨基酸序列。

[0311] 在一些实施方式中,本文提供的抗191P4D12抗体包含由杂交瘤产生的名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的重链和轻链可变区,所述杂交瘤以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏(参见,图3),或者包含这样的氨基酸序列的重链和轻链可变区,所述氨基酸序列与Ha22-2(2,4)6.1的重链和轻链可变区氨基酸序列具有同源性,并且其中抗体保留了本文提供的抗191P4D12抗体所需的功能特性。作为本发明抗体的恒定区,可以选择恒定区的任何亚类。在一个实施方式中,可以使用人IgG1恒定区作为重链恒定区和人Igκ恒定区

作为轻链恒定区。

[0312] 在一些实施方式中,本文提供的抗191P4D12抗体包含由杂交瘤产生的名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的重链和轻链,所述杂交瘤以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏(参见,图3),或者包含这样的氨基酸序列的重链和轻链,所述氨基酸序列与Ha22-2(2,4)6.1的重链和轻链氨基酸序列具有同源性,并且其中抗体保留了本文提供的抗191P4D12抗体所需的功能特性。

[0313] 在一些实施方式中,本文提供的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0314] (a)重链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链可变区氨基酸序列具有至少80%同源性;和

[0315] (b)轻链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变区氨基酸序列具有至少80%同源性。

[0316] 在一些实施方式中,重链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链可变区氨基酸序列具有至少85%同源性。在其它实施方式中,重链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链可变区氨基酸序列具有至少90%同源性。在其它实施方式中,重链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链可变区氨基酸序列具有至少95%同源性。在其它实施方式中,重链可变区可以与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链可变区氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性。

[0317] 在一些实施方式中,轻链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变区氨基酸序列具有至少85%同源性。在其它些实施方式中,轻链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变区氨基酸序列具有至少90%同源性。在其它些实施方式中,轻链可变区包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变区氨基酸序列具有至少75%同源性。在其它实施方式中,轻链可变区可以与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变区氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性。

[0318] 在其它实施方式中,本文提供的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,其中:

[0319] (a)重链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链氨基酸序列具有至少80%同源性;和

[0320] (b)轻链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心

(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链氨基酸序列具有至少80％同源性。

[0321] 在一些实施方式中,重链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链氨基酸序列具有至少85％同源性。在其它实施方式中,重链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链氨基酸序列具有至少90％同源性。在其它实施方式中,重链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链氨基酸序列具有至少95％同源性。在其它实施方式中,重链可以与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的重链氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同源性。

[0322] 在一些实施方式中,轻链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链氨基酸序列具有至少85％同源性。在其它实施方式中,轻链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链氨基酸序列具有至少90％同源性。在其它实施方式中,轻链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链氨基酸序列具有至少95％同源性。在其它实施方式中,轻链可以与以美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-11267保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同源性。

[0323] 本文提供的工程改造抗体包括已对VH和/或VL内框架残基进行修饰的那些(例如,以改善抗体的特性)。通常,进行这类框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基“回复突变”为相应的种系序列。更具体地,经历体细胞突变的抗体可能含有与衍生抗体的种系序列不同的框架残基。这类残基可通过将抗体框架序列与衍生抗体的种系序列进行比较来鉴定。为了使框架区序列返回到它们的种系构型,可以通过例如定点诱变或PCR介导的诱变将体细胞突变“回复突变”为种系序列(例如,从亮氨酸“回复突变”为甲硫氨酸)。这类“回复突变的”抗体也旨在行涵盖在本发明中。

[0324] 另一种类型的构架修饰涉及使构架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基突变,以去除T细胞表位,从而降减少体潜在的免疫原性。这种方法也称为“去免疫化”并在Carr等的美国专利公开号2003/0153043中更详细地描述。

[0325] 除了在框架或CDR区内进行的修饰之外或以外,本发明的抗体可以经工程改造以在Fc区内包括修饰,通常以改变抗体的一种或多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本文提供的抗191P4D12抗体可以经化学修饰(例如,一个或多个化学部分可以连接到抗体上)或经修饰以改变其糖基化,再次改变抗体的一种或多种功能特性。下文进一步详细描述了这些实施方式中的每一个。

[0326] 在一个实施方式中,CHI的铰链区经修饰,从而使铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。该方法在Bodmer等的美国专利号5,677,425中进一步描述。例如,改变CH1铰链区中半胱氨酸残基的数量,以促进轻链和重链的组装或增加或降低抗191P4D12抗体的稳定性。

[0327] 在另一实施方式中,抗体的Fc铰链区经突变,以减少抗191P4D12抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域,从而使该抗体相对于天然Fc-铰链结构域SpA结合而言具有受损的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合。该方法在Ward等的美国专利号6,165,745中进一步描述。

[0328] 在另一个实施方式中,抗191P4D12抗体经修饰以增加其生物半衰期。各种方法都是可能的。例如,可以引入突变,如Ward的美国专利号6,277,375中所述。或者,为了增加生物半衰期,可以在CH1或CL区内改变抗体,以含有取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等的美国专利号5,869,046和6,121,022所述。

[0329] 在其他实施方式中,通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基来改变Fc区以改变抗体的一种或多种效应功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸特异性残基的一个或多个氨基酸,从而使抗体对效应配体的亲和力改变但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法在Winter等的美国专利号5,624,821和5,648,260中进一步描述。

[0330] 抗191P4D12抗体与191P4D12相关蛋白的反应性可以通过多种众所周知的方式来建立,包括Western印迹、免疫沉淀、ELISA和FACS分析,适当时使用191P4D12相关蛋白、191P4D12-表达细胞或其提取物。191P4D12抗体或其片段可以用可检测标志物标记或与第二分子偶联。合适的可检测标志物包括但不限于:放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合剂或酶。此外,使用本领域公知的方法产生对两个或更多个191P4D12表位具有特异性的双特异性抗体。同源二聚抗体也可以通过本领域已知的交联技术产生(例如,Wolff等,CancerRes.53:2560-2565)。

[0331] 在另一具体实施方式中,本文提供的抗191P4D12抗体是包含命名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的重链和轻链的抗体。Ha22-2(2,4)6.1的重链由SEQ ID NO:7的第20个E残基至第466个K残基的氨基酸序列组成,而Ha22-2(2,4)的轻链由SEQ ID NO:8序列的第23个D残基到236个C残基的氨基酸序列组成。

[0332] 产生命名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的杂交瘤于2010年8月18日送自(通过联邦快递)美国典型培养物保藏中心(ATCC),邮政信箱1549,弗吉尼亚州马纳萨斯20108并指定了登录号PTA-11267。

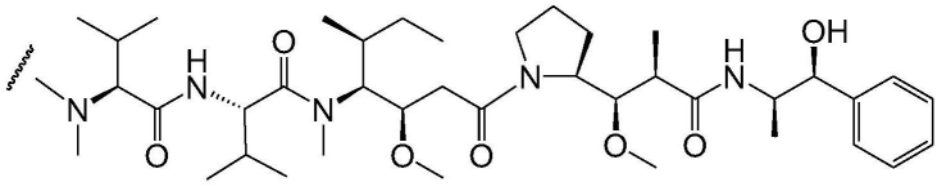
[0333] 5.3.2细胞毒剂(药物单元)

[0334] 在一些实施方式中,ADC包含与海兔毒素或海兔毒素肽类似物和衍生物澳瑞他汀偶联的抗体或其抗原结合片段(美国专利号5,635,483;5,780,588)。已知海兔毒素和澳瑞他汀干扰微管动力学、GTP水解和以及核和细胞分裂(Woyke等,(2001)Antimicrob.Agents and Chemother.45(12):3580-3584)并具有抗癌(美国专利号5,663,149)和抗真菌活性(Pettit等,(1998)Antimicrob.Agents Chemother.42:2961-2965)。海兔毒素或澳瑞他汀药物单元可以通过肽药物单元的N(氨基)末端或C(羧基)末端连接抗体(WO02/088172)。

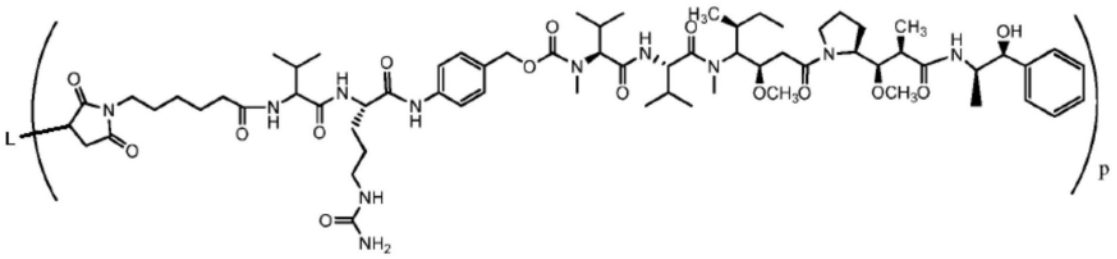
[0335] 示例性的澳瑞他汀实施方式包括N-末端连接的单甲基澳瑞他汀药物单元DE和DF,公开于“Senter等,美国癌症研究协会会刊(Proceedings of the American Association for Cancer Research),第45卷,摘要编号623,2004年3月28日提交并描述于美国专利公开号2005/0238649,其公开的全部内容通过引用明确地纳入。

[0336] 在一些实施方式中,@@澳瑞他汀是MMAE(其中波浪线表示共价连接与抗体药物偶

联物的接头)。

[0337] 
MMAE

[0338] 在一些实施方式中,包含MMAE和接头组件(本文进一步描述)的示例性实施方式具有下述结构(其中L代表抗体且p的范围为1至12):

[0339] 

[0340] 通常,可以通过在两个或多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备基于肽的药物单元。例如,可以根据肽化学领域熟知的液相合成方法(参见,E.Schröder和K.Lübke,"肽学(The Peptides)",第1卷,第76-136页,1965,学术出版社(Academic Press))制备这类肽键。可以根据下述方法制备澳瑞他汀/尾海兔素:US 5635483;US 5780588;Pettit等(1989)J.Am.Chem.Soc.111:5463-5465;Pettit等(1998)Anti-Cancer Drug Design 13:243-277;Pettit,G.R.,等.Synthesis,1996,719-725;Pettit等(1996)J.Chem.Soc.Perkin Trans.15:859-863;和Doronina(2003)Nat Biotechnol 21(7):778-784。

[0341] 5.3.3接头

[0342] 通常,抗体药物偶联物包含药物单元(例如MMAE)和抗体单元(例如抗191P4D12抗体或其抗原结合片段)之间的接头单元。在一些实施方式中,接头在胞内条件下是可裂解的,从而使接头的裂解在胞内环境中由抗体释放药物单元。在其他实施方式中,接头单元不可裂解的,并且例如,药物通过抗体降解而释放。

[0343] 在一些实施方式中,接头可以通过存在于胞内环境中(例如,在溶酶体或内体或胞膜窖)的裂解剂进行裂解。接头可以是例如这样的肽基接头,其被胞内肽酶或蛋白酶裂解,包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶。在一些实施方式中,肽基接头的长度为至少两个氨基酸或至少三个氨基酸。裂解剂可以包括组织蛋白酶B和D以及纤溶酶,已知所有这些都可以水解二肽药物衍生物,导致活性药物在靶细胞内释放(参见例如,Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123)。最典型的是可被表达191P4D12的细胞中存在的酶裂解的肽基接头。例如,可以使用将被癌组织中高度表达的硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶B裂解的肽基接头(例如,Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly接头(SEQ ID NO:15))。这类接头的其它示例述于例如美国专利号6,214,345,通过引用其全部内容将其纳入本文用于所有目的。在具体实施方式中,胞内蛋白酶裂解的肽基接头是Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见例如,美国专利号6,214,345,其描述了用Val-Cit接头合成多柔比星)。使用治疗剂的胞内蛋白水解释放的一个优点是当偶联时该试剂通常被减弱并且偶联物的血清稳定性通常很高。

[0344] 在其它实施方式中,可裂解接头具有pH敏感性,即某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感性接头在酸性条件下水解。例如,可使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(如

腙、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺式-乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如,美国专利号5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123;Neville等,1989,Biol.Chem.264:14653-14661.)。这样的接头在中性pH条件(例如血液中那些)下相对稳定,但是在低于pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH值)时不稳定。在某些实施方式中,可水解接头是硫醚接头(如通过酰腙键连接治疗剂的硫醚(参见例如,美国专利号5,622,929))。

[0345] 在其它实施方式中,该接头在还原条件下可裂解(如二硫化物接头)。本领域已知多种二硫化物接头,包括例如,可用SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫)甲苯)、SPDB和SMPT形成的那些(参见例如,Thorpe等,1987,Cancer Res.47:5924-5931;Wawrzynczak等,刊于《免疫偶联物:癌症的放射成像和治疗中的抗体偶联物(Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer)》(C.W.Vogel编,牛津大学出版社(Oxford U.Press),1987。还参见美国专利号4,880,935)。

[0346] 在其它具体实施方式中,接头是丙二酸接头(Johnson等,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰接头(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

[0347] 在其他实施方式中,接头单元不可裂解的,并且药物通过抗体降解而释放。(见美国公开号2005/0238649,通过引用其全部内容纳入本文用于所有目的)。

[0348] 通常,接头基本上对胞外环境不敏感。如本文所用,在接头的上下文中,"对胞外环境基本上不敏感"指当抗体药物偶联物存在于胞外环境中(例如,在血浆中)时,抗体药物偶联物的样品中不超过约20%,通常不超过约15%,更通常不超过约10%,甚至更多通常不超过约5%、不超过约3%或不超过约1%的接头被裂解。例如,可以通过将抗体药物偶联物化合物与血浆赋予预定时间段(例如,2、4、8、16或24小时)然后对血浆中存在的游离药物的量进行定量确定接头是否对胞外环境基本上不敏感。

[0349] 在其他非互斥的实施方式中,接头促进胞内化。在某些实施方式中,在与治疗剂偶联时(即在如本文所述的抗体药物偶联物化合物的接头治疗剂部分的环境中)促进细胞内化。在其他实施方式中,当与澳瑞他汀化合物和抗191P4D12抗体或其抗原结合片段偶联时,接头促进细胞内化。

[0350] 可用于本发明组合物和方法的多种示例性接头描述于WO2004-010957、美国公开号2006/0074008、美国公开号20050238649和美国公开号2006/0024317(其各自通过引用其全部内容纳入本文)。

[0351] "接头单元"(LU)是可用于连接药物单元和抗体单元以形成抗体药物偶联物的双功能化合物。在一些实施方式中,接头单元具有下式:

[0352] $-A_a-W_w-Y_y-$

[0353] 其中:-A-是延伸体单元,

[0354] a是0或1,

[0355] 各-W-独立地为氨基酸单元,

[0356] w是0-12的整数,

[0357] -Y-是自毁型间隔单元,和

[0358] y是0、1或2。

[0359] 在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,和y是0、1或2。在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,和y是0或1。在一些实施方式中,当w是1-12时,y是1或2。在一些实施方式中,w是2-12,和y是1或2。在一些实施方式中,a是1,和w和y是0。

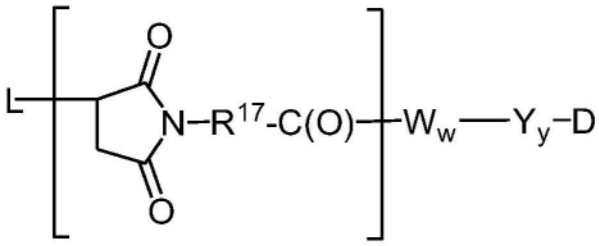
[0360] 5.3.3.1延伸体单元

[0361] 当存在时,延伸体单元(A)能够将抗体单元与氨基酸单元(-W-)(如果存在)连接到间隔单元(-Y-)(如果存在);或到药物单元(-D)。可以天然地或通过化学操作存在于抗191P4D12抗体或其抗原结合片段(例如Ha22-2(2,4)6.1)上的有用官能团包括但不限于:巯基、氨基、羟基、碳水化合物的异头羟基和羧基。合适的官能团是巯基和氨基。在一个实例中,巯基基团可以通过还原抗191P4D12抗体或其抗原结合片段的分子内二硫键来生成。在另一个实施方式中,巯基可以通过抗191P4D12抗体或抗原结合片段的赖氨酸部分的氨基基团与2-亚氨基硫杂环已烷(2-iminothiolane)(塔氏试剂(Traut's reagent))或其他巯基生成试剂反应来生成。在某些实施方式中,抗191P4D12抗体或其抗原结合片段是重组抗体并且经工程改造以携带一个或多个赖氨酸。在某些其他实施方式中,重组抗191P4D12抗体经工程改造以携带其它巯基,例如,额外的半胱氨酸。

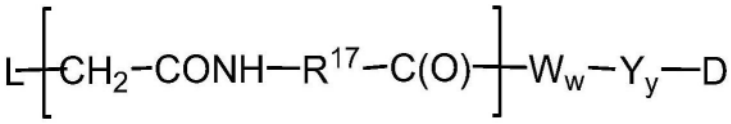
[0362] 在一个实施方式中,延伸体单元与抗体单元的硫原子形成键。硫原子可以源自抗体的巯基。该实施方式的代表性延伸体单元在下述式IIIa和IIIb的方括号内描述,其中L-、-W-、-Y-、-D、w和y如上所定义,并且R^{17}选自:-C_1-C_{10}亚烷基-、-C_1-C_{10}亚烯基-、-C_1-C_{10}亚炔基-、碳环-、-O-(C_1-C_8亚烷基)-、O-(C_1-C_8亚烯基)-、-O-(C_1-C_8亚炔基)-、-亚芳基-、-C_1-C_{10}亚烷基-亚芳基-、-C_2-C_{10}亚烯基-亚芳基、-C_2-C_{10}亚炔基-亚芳基、-亚芳基-C_1-C_{10}亚烷基-、-亚芳基-C_2-C_{10}亚烯基-、-亚芳基-C_2-C_{10}亚炔基-、-C_1-C_{10}亚烷基-(碳环)-、-C_2-C_{10}亚烯基-(碳环)-、-C_2-C_{10}亚炔基-(碳环)-、-(碳环)-C_1-C_{10}亚烷基-、-(碳环)-C_2-C_{10}亚烯基-、-(碳环)-C_2-C_{10}亚炔基、-杂环-、-C_1-C_{10}亚烷基-(杂环)-、-C_2-C_{10}亚烯基-(杂环)-、-C_2-C_{10}亚炔基-(杂环)-、-(杂环)-C_1-C_{10}亚烷基-、-(杂环)-C_2-C_{10}亚烯基-、-(杂环)-C_1-C_{10}亚炔基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-或-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-,并且r是1-10的整数,其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环(carbocycle)、碳环(carbocyclo)、杂环和亚芳基,无论是单独的还是作为另一基团的部分,任选地被取代。在一些实施方式中,所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环、碳环、杂环和亚芳基,无论是单独的还是作为另一基团的部分,都是未取代的。

[0363] 在一些实施方式中,R^{17}选自:-C_1-C_{10}亚烷基-、-碳环-、-O-(C_1-C_8亚烷基)-、-亚芳基-、-C_1-C_{10}亚烷基-亚芳基-、-亚芳基-C_1-C_{10}亚烷基-、-C_1-C_{10}亚烷基-(碳环)-、-(碳环)-C_1-C_{10}亚烷基-、-C_3-C_8杂环-、-C_1-C_{10}亚烷基-(杂环)-、-(杂环)-C_1-C_{10}亚烷基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-和-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-;并且r是1-10的整数,其中所述亚烷基基团未被取代并且所述基团的其余部分被任选地取代。

[0364] 从所有示例性实施方式应理解的是,即使在未明确表示的情况下,1-20个药物单元也可连接至抗体单元(p=1-20)。

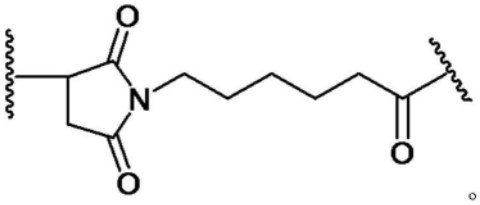
[0365] 

IIIa

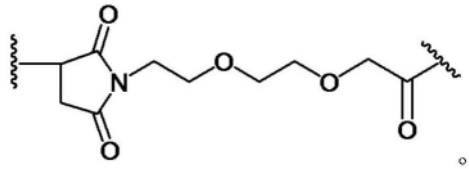
[0366] 

IIIb

[0367] 示例性的延伸体单元是式IIIa的延伸体单元,其中R^{17}是-$(CH_2)_5$-:

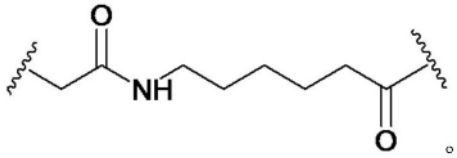
[0368] 

[0369] 另一说明性的延伸体单元是式IIIa的延伸体单元,其中R^{17}是-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-;并且r是2:

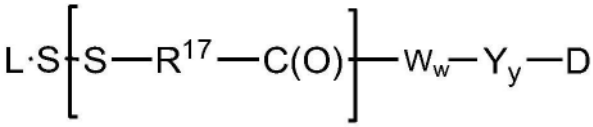
[0370] 

[0371] 示例性的延伸体单元是式IIIa的延伸体单元,其中R^{17}是亚芳基-或亚芳基-C_1-C_{10}亚烷基-。在一些实施方式中,芳基是未取代的苯基。

[0372] 另一示例性延伸体单元是式IIIb的延伸体单元,其中R^{17}是-$(CH_2)_5$-:

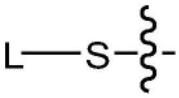
[0373] 

[0374] 在某些实施方式中,延伸体单元通过抗体单元的硫原子和延伸体单元的硫原子之间的二硫键连接到抗体单元。该实施方式的代表性延伸体单元述于式IV的方括号内,其中R^{17}、L-、-W-、-Y-、-D、w和y如上所定义。

[0375] 

IV

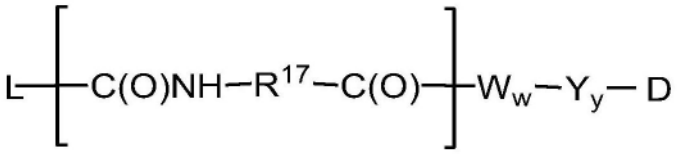
[0376] 应当注意到是,在本申请全文中,除非上下文另有说明,下式中的S部分指抗体单元的硫原子。

[0377] 

[0378] 在本文中硫连接的ADC的某些结构描述中,抗体表示为“L”。其也可以表示为“Ab-

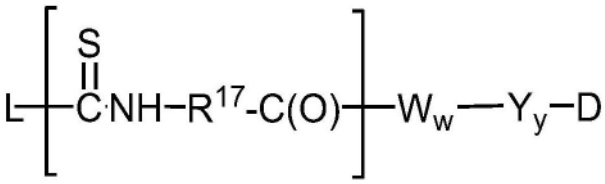
S”。包含“S”仅表示硫键特征,并不表示特定硫原子具有多个接头-药物部分。使用“Ab-S”描述的结构的左括号也可以放置在硫原子的左侧,在Ab和S之间,这将是本文通篇描述的本发明的ADC的等效描述。

[0379] 在其他实施方式中,延伸体单元包含可与抗体单元的伯氨基基团或仲氨基基团形成键的反应位点。这些反应位点的实例包括但不限于:活化的酯,例如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、酰氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯。该实施方式的代表性延伸体单元述于式Va和Vb的方括号内,其中-R^{17}-、L-、-W-、-Y-、-D、w和y如上所定义。



Va

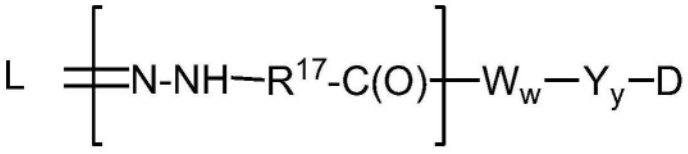
[0380]



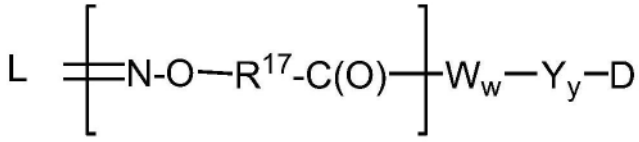
Vb

[0381] 在一些实施方式中,拉伸物包含与修饰的碳水化合物(-CHO)基团反应的反应位点,所述修饰的-CHO基团可存在于抗体单元上。例如,可以使用诸如高碘酸钠的试剂温和地氧化碳水化合物,并且可以使用拉伸物浓缩所产生的氧化碳水化合物的(-CHO)单元,所述拉伸物包含官能团,诸如酰肼、肟、伯胺和仲胺、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸盐/酯和芳酰肼,诸如Kaneko等,1991,Bioconjugate Chem.2:133-41中所述的那些。该实施方式的代表性延伸体单元述于式VIa、VIb和VIc的方括号内,其中-R^{17}-、L-、-W-、-Y-、-D、w和y如上所定义。

[0382]

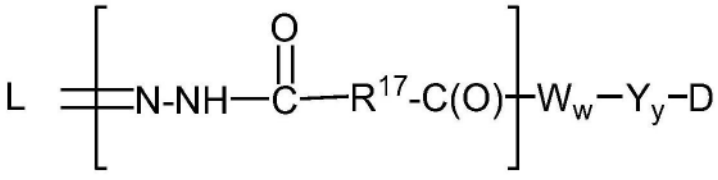


VIa



VIb

[0383]



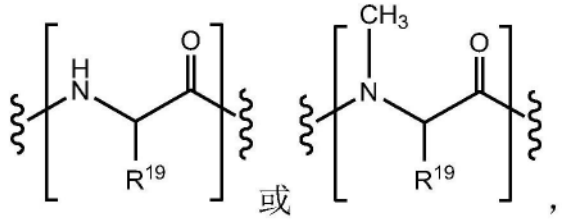
VIc

[0384] 5.3.3.2氨基酸单元

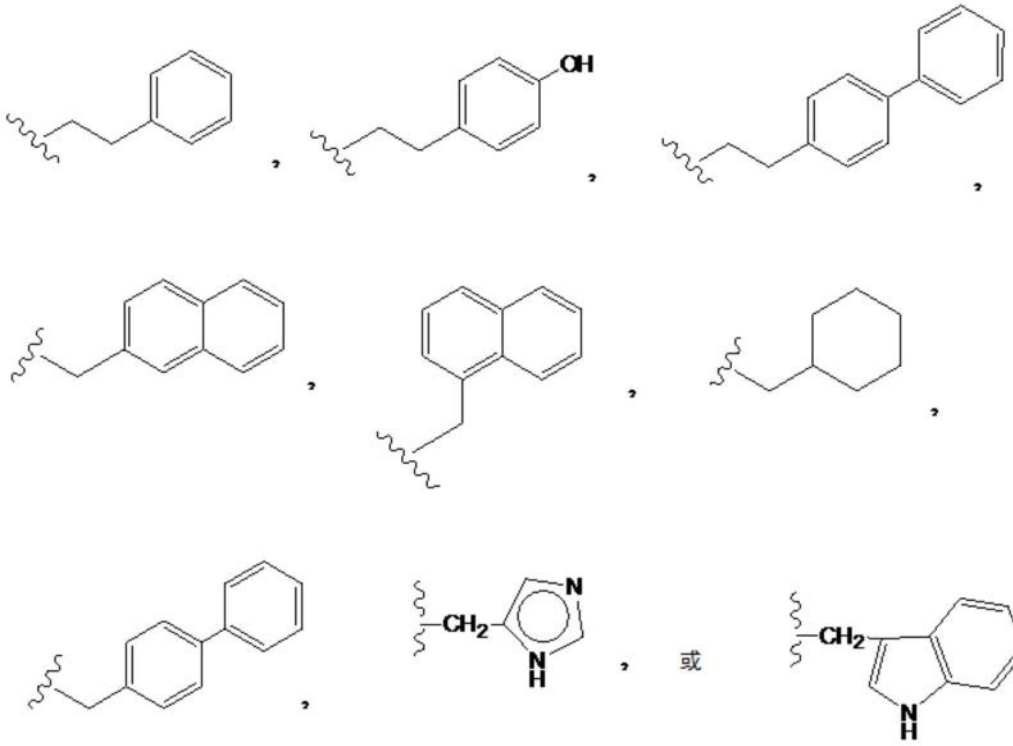
[0385] 当存在时,氨基酸单元(-W-)将延伸体单元连接到间隔单元(如果间隔单元存在),将延伸体单元连接到药物单元(如果间隔单元不存在),和将抗体单元连接到药物单元(如果不存在延伸体单元和间隔单元)。

[0386] 例如,W_w-可以是单肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一

肽或十二肽单元。各-W-单元独立地具有以下方括号中表示的式,并且w为0到12之间的整数

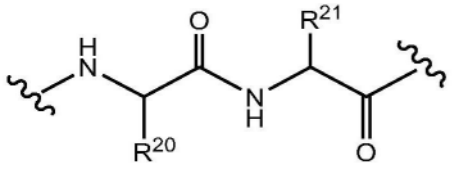
[0387] 

[0388] 其中R^{19}是氢、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、$-CH_2OH$、$-CH(OH)CH_3$、$-CH_2CH_2SCH_3$、$-CH_2CONH_2$、$-CH_2COOH$、$-CH_2CH_2CONH_2$、$-CH_2CH_2COOH$、$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、$-(CH_2)_3NH_2$、$-(CH_2)_3NHCOCH_3$、$-(CH_2)_3NHCHO$、$-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$-(CH_2)_4NH_2$、$-(CH_2)_4NHCOCH_3$、$-(CH_2)_4NHCHO$、$-(CH_2)_3NHCONH_2$、$-(CH_2)_4NHCONH_2$、$-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶甲基-、3-吡啶甲基-、4-吡啶甲基-、苯基、环己基,

[0389] 

[0390] 在一些实施方式中,可以通过一种或多种酶来酶促裂解氨基酸单元,包括癌症或肿瘤相关蛋白酶,以释放药物单元(-D),其中在一个实施方式中,在体内释放时被质子化以提供药物(D)。

[0391] 在某些实施方式中,氨基酸单元包含天然氨基酸。在其他实施方式中,氨基酸单元包含非天然氨基酸。说明性的Ww单元由下述式VII-IX表示:

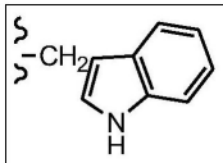
[0392]  VII

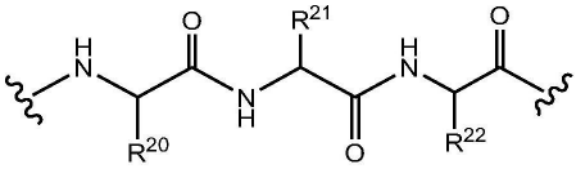
[0393] 其中R^{20}和R^{21}如下所示:

[0394]

R^{20}	R^{21}
苄基	$(CH_2)_4NH_2$;
甲基	$(CH_2)_4NH_2$;
异丙基	$(CH_2)_4NH_2$;
异丙基	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
苄基	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
异丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
仲丁酯	$(CH_2)_3NHCONH_2$;

[0395]

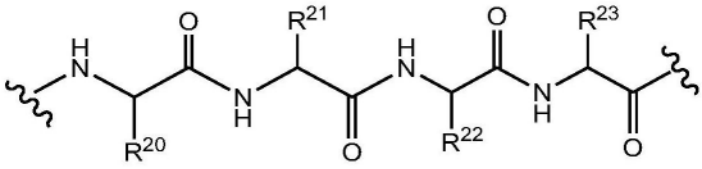
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
苄基	甲基;
苄基	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

[0396]  **VIII**

[0397] 其中R^{20}、R^{21}和R^{22}如下所示:

[0398]

R^{20}	R^{21}	R^{22}
苄基	苄基	$(CH_2)_4NH_2$;
异丙基	苄基	$(CH_2)_4NH_2$;和
H	苄基	$(CH_2)_4NH_2$;

[0399]  **IX**

[0400] 其中R^{20}、R^{21}、R^{22}和R^{23}如下所示:

[0401]

R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
H	苄基	异丁基	H;和
甲基	异丁基	甲基	异丁基.

[0402] 示例性氨基酸单元包括但不限于上述式VII的单元,其中:R^{20}是苄基和R^{21}是-$(CH_2)_4NH_2$;R^{20}是异丙基和R^{21}是-$(CH_2)_4NH_2$;或R^{20}是异丙基和R^{21}是-$(CH_2)_3NHCONH_2$。

[0403] 另一个示例性氨基酸单元是式VIII的单元,其中R^{20}是苄基,R^{21}是苄基,和R^{22}是-$(CH_2)_4NH_2$。

[0404] 可以设计有用的-W_w-单元并优化其对特定的酶进行的酶促裂解的选择性,例如,

肿瘤相关蛋白酶。在一个实施方式中，-W_w-单元是对其的裂解是由组织蛋白酶B、C和D或纤溶酶蛋白酶催化的单元。

[0405] 在一个实施方式中，-W_w-是二肽、三肽、四肽或五肽。当R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22}或R^{23}不是氢时，R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22}或R^{23}连接的碳原子是手性的。

[0406] R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22}或R^{23}连接的每个碳原子独立地处于(S)或(R)构型。

[0407] 在一个具体实施方式中，氨基酸单元是缬氨酸-瓜氨酸(vc或Val-Cit)。在另一个具体实施方式中，氨基酸单元是苯丙氨酸-赖氨酸(即fk)。在又一个具体实施方式中，氨基酸单元是N-甲基缬氨酸-瓜氨酸。在又一个具体的实施方式中，氨基酸单元是5-氨基戊酸、高苯丙氨酸赖氨酸、四异喹啉羧酸赖氨酸、环己基丙氨酸赖氨酸、异果胶酸赖氨酸、β-丙氨酸赖氨酸、甘氨酸丝氨酸缬氨酸谷氨酰胺和异果胶酸。

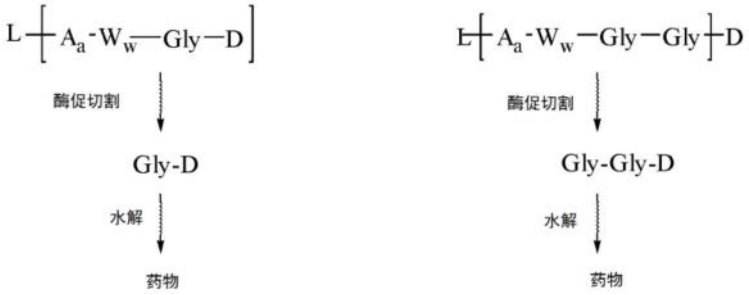
[0408] 5.3.3.3间隔单元

[0409] 当氨基酸单元存在时，间隔单元(-Y-)在存在时将氨基酸单元连接至药物单元。或者，当氨基酸单元不存在时，间隔单元将延伸体单元连接到药物单元。当氨基酸单元和延伸体单元都不存在时，间隔单元还将药物单元连接到抗体单元。

[0410] 间隔单元有两种一般类型：非自毁型(non self-immolative)的或自毁型。非自毁型间隔单元是这样的间隔单元，其中部分或全部间隔单元在由抗体药物偶联物裂解，特别是酶促裂解氨基酸单元后保持与药物单元结合。非自毁型间隔单元的示例包括但不限于：(甘氨酸-甘氨酸)间隔单元和甘氨酸间隔单元(均在方案1中描述)(下文)。当含有甘氨酸-甘氨酸间隔单元或甘氨酸间隔单元的偶联物通过酶(例如，肿瘤细胞相关蛋白酶、癌细胞相关蛋白酶或淋巴细胞相关蛋白酶)进行酶切时，甘氨酸-甘氨酸-药物单元或甘氨酸-药物单元裂解自L-Aa-Ww-。在一个实施方式中，在靶细胞内发生独立的水解反应，裂解甘氨酸-药物单元键并释放药物。

[0411] 方案1

[0412]



[0413] 在一些实施方式中，非自毁型间隔单元(-Y-)是-Gly-。在一些实施方式中，非自毁型间隔单元(-Y-)是-Gly-Gly-。

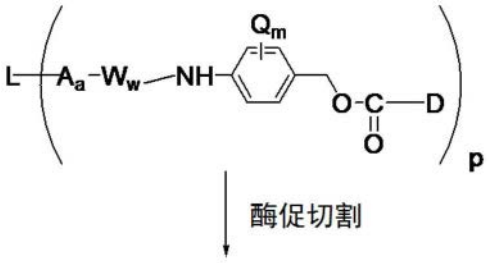
[0414] 在一个实施方式中，不存在间隔单元(-Y_y-，其中y＝0)。

[0415] 或者，包含自毁型间隔单元的抗体药物偶联物可释放-D。如本文所用，术语“自毁型间隔物”指能够将两个间隔开的化学部分共价连接在一起形成稳定的三方分子的双功能化学部分。如果它与第一个部分的键断裂，它将自发地与第二个化学部分分离。

[0416] 在一些实施方式中，-Y_y-是对氨基苯甲醇(PAB)单元(参见方案2和3)，其的亚苯基部分被Q_m取代，其中Q是-C_1-C_8烷基、-C_1-C_8烯基、-C_1-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_1-C_8烯基)、-O-(C_1-C_8炔基)、-卤素，-硝基或-氰基；和m是0-4的整数。烷基、烯基和炔基，无论是单独的还是作为另一个基团的部分，都可以任选地被取代。

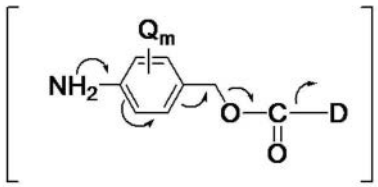
[0417] 在一些实施方式中,-Y-是PAB基团,其通过PAB基团的氨基氮原子连接到-W_w-,并通过碳酸酯、氨基甲酸酯或醚基团直接连接到-D。不受任何特定理论或机制的束缚,方案2描述了PAB基团的药物释放的可能机制,其通过氨基甲酸酯或碳酸酯基团直接连接到-D,如Toki等,2002,J.Org.Chem.67:1866-1872所述。

[0418] 方案2



酶促切割

[0419]



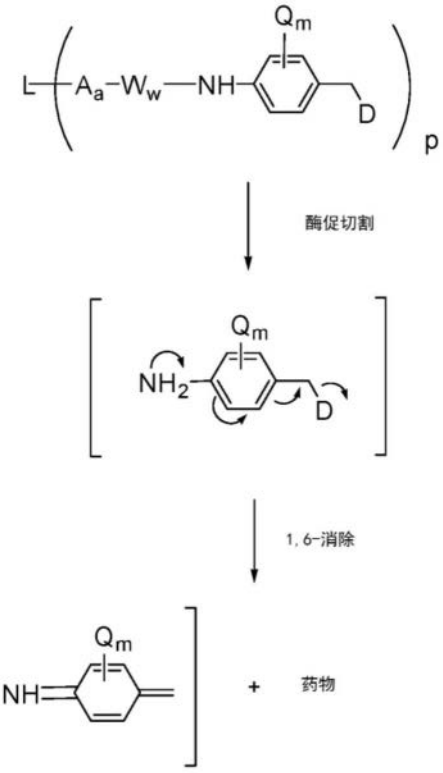
1,6-消除

药物

[0420] 在方案2中,Q是-C_1-C_8烷基、-C_1-C_8烯基、-C_1-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_1-C_8烯基)、-O-(C_1-C_8炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m为0-4之间的整数;和p为1至约20。烷基、烯基和炔基,无论是单独的还是作为另一个基团的部分,都可以任选地被取代。

[0421] 不受任何特定理论或机制的束缚,方案3描述了PAB基团的药物释放的可能机制,其通过醚或胺连接直接连接到-D,其中D包括部分药物单元的氧或氮基团。

[0422] 方案3

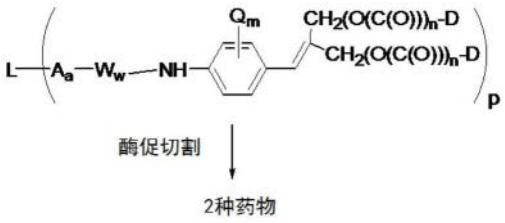
[0423] 

[0424] 在方案3中,Q是-C_1-C_8烷基、-C_1-C_8烯基、-C_1-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_1-C_8烯基)、-O-(C_1-C_8炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m为0-4之间的整数;和p为1至约20。烷基、烯基和炔基,无论是单独的还是作为另一个基团的部分,都可以任选地被取代。

[0425] 自毁型间隔物的其他示例包括但不限于:在电子学上与PAB基团相似的芳族化合物,例如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等,1999,Bioorg.Med.Chem.Lett.9:2237)和邻或对氨基苄基缩醛。可以使用在酰胺键水解时经历环化的间隔物,例如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等,1995,Chemistry Biology 2:223),适当取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系统(Storm等,1972,J.Amer.Chem.Soc.94:5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等,1990,J.Org.Chem.55:5867)。消除在甘氨酸的α位取代的含胺药物(Kingsbury等,1984,J.Med.Chem.27:1447)也是自毁型间隔物的示例。

[0426] 在一个实施方式中,间隔单元是如方案4中描述的支化双(羟甲基)-苯乙烯(BHMS)单元,其可用于纳入和释放多种药物。

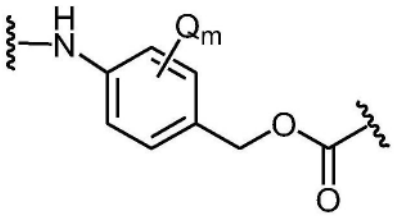
[0427] 方案4

[0428] 

[0429] 在方案4中,Q是-C_1-C_8烷基、-C_1-C_8烯基、-C_1-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_1-C_8烯基)、-O-(C_1-C_8炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m为0-4之间的整数;n为0或1;p的范围为1至约20。烷基、烯基和炔基,无论是单独的还是作为另一个基团的部分,都可以任选地被取代。

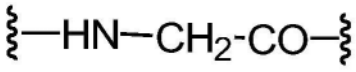
[0430] 在一些实施方式中,-D单元是相同的。在另一个实施方式中,-D部分是不同的。

[0431] 在一方面中,间隔单元(-Y_y-)由式X-XII表示:

[0432] 

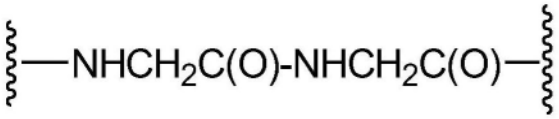
X

[0433] 其中Q是-C_1-C_8烷基、-C_1-C_8烯基、-C_1-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_1-C_8烯基)、-O-(C_1-C_8炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m为0-4的整数。烷基、烯基和炔基,无论是单独的还是作为另一个基团的部分,都可以任选地被取代。

[0434] 

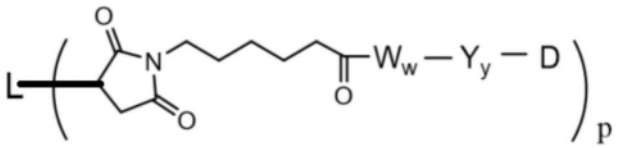
XI

[0435] 和

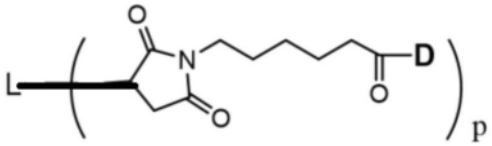
[0436] 

XII。

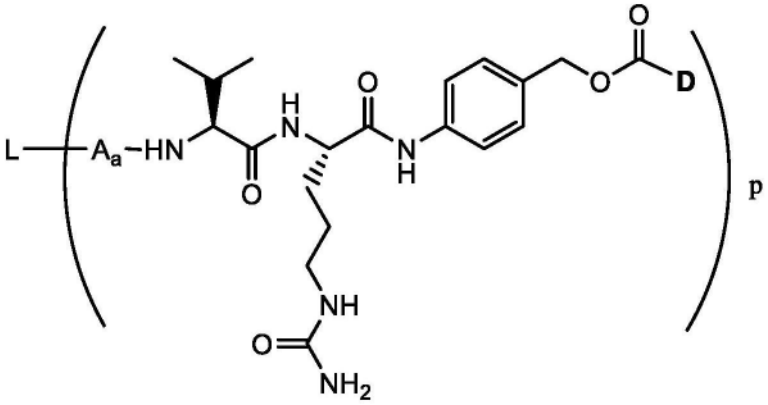
[0437] 包含抗体药物偶联物化合物的式I和II的实施方式可以包括:

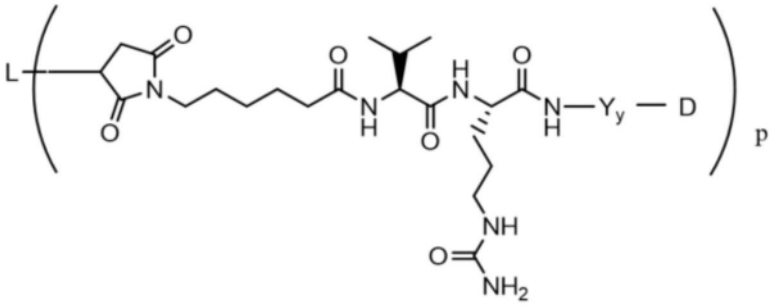
[0438] 

[0439] 其中,w和y各自为0、1或2,和

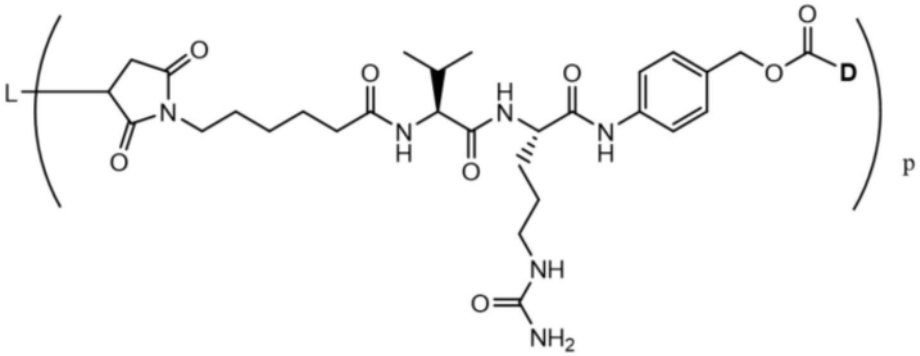
[0440] 

[0441] 其中,w和y各自为0,



[0442] 

，和



[0443] 5.3.3.4药物加载

[0444] 载药加载由p表示并且是分子中各抗体的平均药物单位数。药物加载的范围可以为1-20个药物(D)/抗体。本文提供的ADC包括与一定范围的药物单位(例如1-20)偶联的抗体或抗原结合片段的集合。来自偶联反应的ADC制备物中各抗体的平均药物单位数可以通过常规方法表征,例如质谱和ELISA试验。也可以确定ADC在p方面的定量分布。在一些情况中,可以通过诸如电泳之类的手段实现对同质ADC的分离、纯化和表征,其中p是来自具有其他药物加载的ADC的特定值。

[0445] 在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-20。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-18。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-15。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-12。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-10。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-9。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-8。在某

些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-7。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-6。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-5。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-4。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-3。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为2-12。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为2-10。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为2-9。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为2-8。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为2-7。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为2-6。在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为2-5。

[0446] 在某些实施方式中,本文提供的ADC的药物加载的范围为1-约8;约2-约6;约3-约5;约3-约4;约3.1-约3.9;约3.2-约3.8;约3.2-约3.7;约3.2-约3.6;约3.3-约3.8;或约3.3-约3.7。

[0447] 在某些实施方式中,在偶联反应期间与抗体偶联的药物单元少于理论最大值。抗体可包含例如不与药物-接头中间体或接头试剂反应的赖氨酸残基。通常,抗体不包含可能与药物单元连接的多种游离和反应性半胱氨酸硫醇基团;实际上,抗体中的大多数半胱氨酸硫醇残基以二硫键的形式存在。在某些实施方式中,可以在部分或全部还原条件下用还原剂如二硫苏糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)还原抗体,以生成反应性半胱氨酸硫醇基团。在某些实施方式中,抗体经受变性条件以显示反应性亲核基团,例如赖氨酸或半胱氨酸。在一些实施方式中,接头单元或药物单元通过抗体单元上的赖氨酸残基偶联。在一些实施方式中,接头单元或药物单元通过抗体单元上的半胱氨酸残基偶联。

[0448] 在一些实施方式中,连接接头单元或药物单元的氨基酸在抗体或其抗原结合片段的重链中。在一些实施方式中,连接接头单元或药物单元的氨基酸在抗体或其抗原结合片段的轻链中。在一些实施方式中,连接接头单元或药物单元的氨基酸在抗体或其抗原结合片段的铰链区中。在一些实施方式中,连接接头单元或药物单元的氨基酸在抗体或其抗原结合片段的Fc区中。在其它实施方式中,连接接头单元或药物单元的氨基酸在抗体或其抗原结合片段的恒定区(例如,重链CH1、CH2或CH2,或者轻链CH1)中。在其它实施方式中,连接接头单元或药物单元的氨基酸在抗体或其抗原结合片段的VH框架区中。在其它实施方式中,连接接头单元或药物单元的氨基酸在抗体或其抗原结合片段的VL框架区中。

[0449] ADC的加载(药物/抗体比)可以以不同方式控制,例如,通过:(i)限制药物-接头中间体或接头试剂相对于抗体的摩尔过量,(ii)限制偶联反应时间或温度,(iii)半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制性还原条件,(iv)通过重组技术改造抗体的氨基酸序列,从而修饰半胱氨酸残基的数量和位置用于控制接头-药物连接的数量和/或位置(例如按照本文和WO2006/034488(通过引用其全部内容纳入本文)中公开制备的thioMab或thioFab)。

[0450] 应当理解的是,当超过一个亲核基团与药物-接头中间体或接头试剂,然后与药物单元试剂反应时,所得产物是ADC化合物的混合物,分布有与抗体单元连接的一种或多种药物单元。可以通过双重ELISA抗体试验由混合物计算各抗体的平均药物数量,其对抗体和药物具有特异性。混合物中的单个ADC分子可以通过质谱法鉴定并通过HPLC分离,例如,疏水相互作用色谱法(参见例如,Hamblett,K.J.,等"药物加载对抗CD30抗体-药物偶联物药理学、药代动力学和毒性的影响(Effect of drug loading on the pharmacology,

pharmacokinetics,and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate),”摘要第624期,美国癌症研究协会(American Association for Cancer Research),2004年年会,2004年3月27-31日,AACR会议录,第45卷,2004年3月;Alley,S.C.,等“控制抗体-药物偶联物中药物连接的位置(Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates),”摘要第627号,美国癌症研究协会,2004年年会,2004年3月27-31日,AACR会议录,第45卷,2004年3月)。在某些实施方式中,可以通过电泳或色谱法由偶联混合物分离具有单一加载值的均质ADC。

[0451] 5.3.3抗体药物偶联物的制备

[0452] 本文提供的抗体药物偶联物的制备可以通过本领域技术人员已知的任何技术来完成。简言之,抗体药物偶联物包含作为抗体单元的抗191P4D12抗体或其抗原结合片段,药物和任选的接合药物和结合剂的接头。在一些实施方式中,该抗体是包含上述命名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的CDR区的抗191P4D12抗体。在具体实施方式中,该抗体是包含上述命名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的重链和轻链可变区的抗191P4D12抗体。在具体实施方式中,该抗体是包含上述命名为Ha22-2(2,4)6.1的抗体的重链和轻链的抗191P4D12抗体。

[0453] 多种不同的反应能够用于药物和/或接头与结合剂的共价连接。这通常通过结合剂(例如抗体分子)的氨基酸残基的反应来完成,包括赖氨酸的胺基,谷氨酸和天冬氨酸的游离羧酸基,半胱氨酸的巯基和芳香族氨基酸的各种部分。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)基团连接到抗体的氨基(或羧基)基团的碳二亚胺反应。此外,双功能试剂如二醛或酰亚胺酯已被用于将化合物的氨基与抗体分子的氨基连接。希夫碱反应也可用于将药物与结合剂连接。该方法涉及对含有二醇或羟基基团的药物进行高碘酸盐氧化,从而形成醛,然后与结合剂反应。连接通过与结合剂的氨基形成希夫碱而发生。异硫氰酸酯也可用作偶联剂,用于将药物与结合剂共价连接。其他技术是本领域技术人员已知的并且在本发明的范围内。

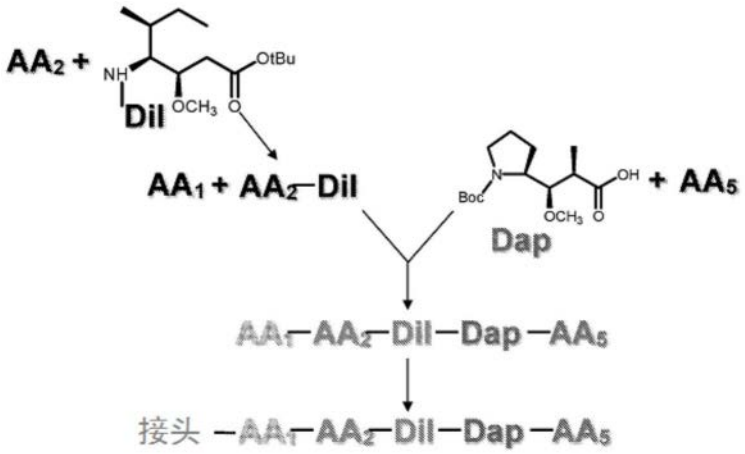
[0454] 在某些实施方式中,作为接头前体的中间体在适当条件下与药物反应。在某些实施方式中,反应基团用于药物和/或中间体。药物与中间体或衍生药物之间反应的产物随后在适当条件下与抗191P4D12抗体反应。

[0455] 本文更详细地描述了抗体药物偶联物的各特定单元。美国专利申请公开号2003-0083263、2005-0238649和2005-0009751中也描述了示例性接头单元、延伸体单元、氨基酸单元、自毁型间隔单元和药物单元的合成和结构,上述专利申请各自通过引用其全部内容纳入本文用于所有目的。

[0456] 下述简要描述用于生成本文提供的抗体药物偶联物的示例性方法。

[0457] 使用本文所述的vc(Val-Cit)接头将Ha22-2(2,4)6.1抗体与澳瑞他汀衍生物MMAE偶联,以使用下述方案产生抗体药物偶联物(ADC)(称之为AGS-22M6E)。使用在下述方案5中示出的通用方法完成vc(Val-Cit)接头与MMAE(西雅图基因技术有限公司(Seattle Genetics,Inc.),华盛顿州西雅图)的偶联,以产生细胞毒性vcMMAE(参见,美国专利号7,659,241)。

[0458] 方案5 vcMMAE合成的通用方法

[0459] 

[0460] 其中:AA1＝氨基酸1

[0461] AA2＝氨基酸2

[0462] AA5＝氨基酸5

[0463] DIL＝多拉异亮氨酸(Dolaisoleuine)

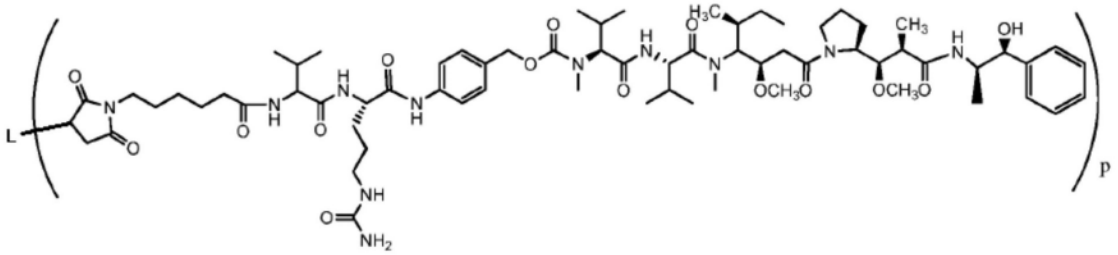
[0464] DAP＝多拉脯氨酸(Dolaproine)

[0465] 接头＝Val-Cit(vc)

[0466] 接下来,使用下述方案制备抗体药物偶联物AGS-22M6E。

[0467] 简言之,Ha22-2(2,4)6.1抗体的10mM乙酸(pH 5.0),1％山梨糖醇,3％ L-谷氨酸的15mg/mL溶液添加20％体积的0.1M Tris Cl(pH 8.4),25mM EDTA和750mM NaCl,以将溶液的pH值调整为7.5,5mMEDTA和150mM氯化钠。然后,通过添加2.3摩尔当量的TCEP(相对于MAb的摩尔数)部分还原抗体,然后在37℃下搅拌2小时。然后,将部分还原的抗体溶液冷却至5℃,添加4.4摩尔当量的vcMMAE(相对于抗体的摩尔数)作为6％(v/v)DMSO溶液。将混合物在5℃下搅拌60分钟,然后在添加1摩尔当量的N-乙酰半胱氨酸(相对于vcMMAE)后再搅拌15分钟。过量淬灭的vcMMAE和其他反应成分通过抗体药物偶联物(ADC)与10体积20mM组氨酸(pH6.0)的超滤/渗滤去除。

[0468] 所得抗体药物偶联物AGS-22M6E具有下式:

[0469] 

[0470] 其中,L为Ha22-2(2,4)6.1,和p为1-20。

[0471] 5.4使用药物组合物的方法

[0472] 在一个方面中,提供了一种预防或治疗对象中疾病或病症的方法,其包括向所述对象给予有效量的本文提供的药物组合物。在一些实施方式中,对象是人对象。

[0473] 在一些实施方式中,所述疾病或病症是癌症。在一些实施方式中,癌症是表达191P4D12的肿瘤细胞。在一些实施方式中,癌症是实体瘤。在一些实施方式中,癌症是结肠癌,胰腺癌,卵巢癌,肺癌,膀胱癌,乳腺癌,食道癌,头癌,或颈癌。在一些实施方式中,癌症

是结肠癌。在一些实施方式中,所述癌症是胰腺癌。在一些实施方式中,癌症是卵巢癌。在一些实施方式中,癌症是肺癌。在一些实施方式中,所述肺癌是小细胞肺癌。在一些实施方式中,所述癌症是膀胱癌。在一些实施方式中,所述癌症是晚期膀胱癌。在一些实施方式中,所述癌症是转移性膀胱癌。在一些实施方式中,所述癌症是尿路上皮癌。在一些实施方式中,所述癌症是晚期尿路上皮癌。在一些实施方式中,所述癌症是乳腺癌。在一些实施方式中,所述癌症是食道癌。在一些实施方式中,所述癌症是头癌。在一些实施方式中,所述癌症是颈癌。在一些实施方式中,所述癌症是晚期或转移性癌症。

[0474] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的治疗适用于已接受一轮或多轮化疗的对象。或者,本文提供的药物组合物与未接受化疗治疗的对象的化疗或辐射方案组合。此外,在一些实施方式中,本文提供的药物组合物的使用可以能够用于降低剂量的伴随化疗,特别是对于不能很好地耐受化疗剂毒性的对象。在一些实施方式中,将本文公开的药物组合物给予在用免疫检查点抑制剂治疗期间或之后显示疾病进展或复发的转移性尿路上皮癌患者。

[0475] 给予本文提供的药物组合物的方法包括但不限于肠胃外给予(例如,皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下)、硬膜外和粘膜(例如,鼻内和口服途径)。在一个具体实施方式中,本文提供的药物组合物鼻内、肌内、静脉内或皮下给予。本文提供的药物组合物可以通过任何方便的途径给药,例如通过输注或推注,通过经由上皮或粘膜皮肤内层(例如口腔粘膜、鼻内粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以和其他生物活性剂一起给予。给药可以是全身给药或局部给药。此外,也可以采用肺部给药,例如,通过使用吸入器或雾化器,以及与雾化剂的制剂。参见例如,美国专利号6,019,968,5,985,320,5,985,309,5,934,272,5,874,064,5,855,913,5,290,540和4,880,078;和PCT公开号WO 92/19244,WO 97/32572,WO 97/44013,WO 98/31346和WO 99/66903,其各自通过引用其全部内容纳入本文。

[0476] 在具体实施方式中,可能需要将本文所提供的药物组合物局部给予需要治疗的区域。例如,这可以通过但不限于下述方式实现:局部输注,通过局部给药(例如通过鼻内喷雾),通过注射或通过植入物的方式,所述植入物是多孔的、无孔的或凝胶状材料,包括膜,例如唾液酸膜或纤维。在一些实施方式中,当给予本文提供的药物组合物时,必须小心使用本文提供的抗体药物偶联物不吸收的材料。

[0477] 在另一实施方式中,本文所提供的药物组合物可以通过囊泡,特别是脂质体(参见Langer,1990,Science 249:1527-1533;Treat等,述于《感染性疾病和癌症治疗中的脂质体》(Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer),Lopez-Berestein和Fidler(编著),Liss,纽约,第353-365页(1989);Lopez-Berestein,同上,第317-327页;参见同上)递送。

[0478] 在另一实施方式中,本文提供的药物组合物可以在控释或持续释放系统中递送。在一实施方式中,可以使用泵以实现控释或缓释(参见例如,Langer,引用如上;Sefton,1987,Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201-40;Buchwald等,1980,Surgery 88:507-16;和Saudek等,1989,N.Engl.J.Med.321:574-74)。在另一实施方式中,聚合材料可以用于实现控释或缓释预防性或治疗性试剂(例如,本文提供的抗体药物)或本文所提供的组合物(参见例如《控释的医疗应用》(Medical Applications of Controlled Release),Langer和Wise(编著),CRC出版社,Boca Raton,Florida(1974);《控释药物生物利用度:药物产品设计和性

能》(Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance),Smolen和Ball(编著),Wiley,New York(1984);Ranger和Peppas),1983,J.,Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61;同样参见Levy等,1985,Science228:190;During等,1989,Ann.Neurol.25:351;Howard等,1989,J.Neurosurg.7 1:105;美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;,美国专利号5912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公开号WO 99/15154和PCT公开号WO 99/20253)。用于缓释制剂的聚合物的示例包括但不限于,聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯),聚(甲基丙烯酸甲酯),聚(丙烯酸),聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯),聚(甲基丙烯酸),聚乙交酯(PLG),聚酐,聚(N-乙烯基吡咯烷酮),聚(乙烯醇),聚丙烯酰胺,聚(乙二醇),聚交酯(PLA),聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施方式中,用于缓释制剂中的聚合物是惰性的,无可浸出杂质,储存稳定,无菌且可生物降解。在另一实施方式中,控释或缓释系统可以放置在治疗靶标,例如,鼻道或肺附近,因此仅需要该全身剂量的部分(参见例如,Goodson,述于《控释的医疗应用》(Medical Applications of Controlled Release),引用如上,第2卷,115-138(1984))。控释系统述于Langer(1990,Science 249:1527-1533)的综述。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来生产包含本文提供的抗体药物偶联物或药物组合物的缓释制剂。参见例如,美国专利号4,526,938,PCT公开号WO 91/05548,PCT公开号WO 96/20698,Ning等.,1996,“使用缓释凝胶的人结肠癌异种移植物的肿瘤内放射免疫疗法(Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel),”Radiotherapy&Oncology 39:179-189,Song等.,1995,“抗体介导的肺靶向长循环乳状液(Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions),”PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology 50:372-397,Cleek等,1997,“用于心血管应用的bFGF抗体的可生物降解聚合物载体(Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application),”Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854,和Lam等,1997,“(微囊化重组人源化单克隆抗体用于局部递送)Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,”Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-760,其各自通过引用其全部内容纳入本文。

[0479] 本文提供的药物组合物在预防和/或治疗癌症中有效的量可以通过标准临床技术确定。此外,可以任选地采用体外测定来帮助确定最佳剂量范围。采用的精确剂量还将取决于给药途径和疾病或病症的严重性,并且应根据从业者的判断和各个对象的情况来决定。有效剂量可从体外或动物模型测试系统所得剂量反应曲线外推。

[0480] 在某些实施方式中,本文提供的治疗方法考虑给予单一ADC以及包含不同抗191P4D12抗体或不同药物单元的不同ADC的组合或混合物。在一些实施方式中,这类方法具有某些优势,因为例如它们包含靶向不同表位、利用不同效应器机制或将细胞毒性抗体与依赖于免疫效应功能的抗体直接组合的ADC。这类方法可以表现出协同治疗效果。此外,本文提供的药物组合物可以与其他治疗方式同时给予,包括但不限于:各种化疗剂和生物剂、雄激素阻断剂、免疫调节剂(例如IL-2、GM-CSF)、手术或辐射。

[0481] 在一个实施方式中,当用本文提供的药物组合物联同化疗剂或辐射或其组合治疗包括人类肿瘤在内的肿瘤时存在协同作用。

[0482] 使用本文提供的药物组合物和化疗或辐射或两者的组合抑制肿瘤细胞生长的方

法包括在开始化疗或放疗之前、期间或之后,以及它们的任何组合时给予本发明的药物组合物(即在开始化疗和/或放疗之前和期间、之前和之后、期间和之后、或之前、期间和之后)。取决于治疗方案和特定患者的需求,该方法以提供最有效治疗并最终延长患者生命的方式进行。

[0483] 化疗剂的给予可以多种方式完成,包括通过肠胃外和肠内途径全身给药。在一个实施方式中,单独给予化疗剂。化疗剂或化疗的具体示例包括顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、放线菌素D、二氯甲基二乙胺(氮芥)、链脲菌素、环磷酰胺、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星(阿霉素)、柔红霉素、丝裂霉素、阿糖孢苷、依托泊苷、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、卡培他滨(紫杉醇)、多西他赛(泰索帝)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、干扰素α、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、链脲佐菌素、他莫昔芬、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、噻替哌、尿嘧啶芥、长春瑞滨、吉西他滨、苯丁酸氮芥、紫杉醇和其组合。

[0484] 与本文提供的药物组合物组合使用的辐射源可以在正在治疗的患者的外部或内部。当该源在患者外部时,这种疗法称为外照射放射疗法(EBRT)。当该辐射源在患者内部时,这种治疗称为近距离放射治疗(BT)。

[0485] 上述治疗方案可以进一步与另外的癌症治疗剂和/或方案组合,例如,其它化疗,癌症疫苗,信号转导抑制剂,能够用于治疗异常细胞生长或癌症的试剂,抗体(例如抗-CTLA-4抗体,如WO/2005/092380(辉瑞公司(Pfizer))中所述)或通过接合IGF-1R和细胞因子来抑制肿瘤生长的其他配体。

[0486] 当哺乳动物接受其它化疗时,可以使用上述化疗剂。此外,可以使用生长因子抑制剂,生物反应调节剂,抗激素疗法,选择性雌激素受体调节剂(SERM),血管生成抑制剂和抗雄激素。例如,可以使用抗激素,例如抗雌激素,如Nolvadex(他莫昔芬)或抗雄激素如Casodex(4'-氰基-3-(4-氟苯基磺酰基)-2-羟基-2-甲基-3-'-(三氟甲基)丙酰苯胺)。

[0487] 在一些实施方式中,本文提供的药物与第二治疗剂联用,例如用于治疗癌症。

[0488] 在一些实施方式中,第二治疗剂是免疫检查点抑制剂。如本文所用,术语"免疫检查点抑制剂"或"检查点抑制剂"是指完全或部分减少,抑制,干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。受特定理论的限制,检查点蛋白调节T细胞激活或功能。已知多种检查点蛋白,例如CTLA-4及其配体CD80和CD86;和PD-1及其配体PD-L1和PD-L2(Pardoll,Nature Reviews Cancer,2012,12,252-264)。这些蛋白质看来负责T细胞反应的共刺激性或抑制性相互作用。免疫检查点蛋白看来调节并维持自我耐受性以及生理免疫应答的持续时间和幅度。疫检查点抑制剂包括抗体或源自抗体。

[0489] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是CTLA-4抑制剂。在一个实施方式中,CTLA-4抑制剂是抗CTLA-4抗体。抗CTLA-4抗体的示例包括但不限于下述美国专利号中描述中的那些:5,811,097;5,811,097;5,855,887;6,051,227;6,207,157;6,682,736;6,984,720;和7,605,238,所有这些通过引用其全部内容纳入。在一个实施方式中,抗CTLA-4抗体是特姆单抗(tremelimumab)(也称为替西单抗(ticilimumab)或CP-675,206)。在一个实施方式中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(ipilimumab)(也称为MDX-010或MDX-101)。伊匹单抗是接合CTLA-4的完全人单克隆IgG抗体。伊匹单抗以商品名Yervoy™销售。

[0490] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是PD-1/PD-L1抑制剂。PD-1/PD-L1抑制剂的示例包括但不限于:美国专利号7,488,802;7,943,743;8,008,449;8,168,757;8,217,149,和PCT专利公开号WO2003042402,WO2008156712,WO2010089411,WO2010036959,WO2011066342,WO2011159877,WO2011082400和WO2011161699,其全部通过引用其全部内容纳入本文。

[0491] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是PD-1抑制剂。在一个实施方式中,PD-1抑制剂是抗PD-1抗体。在一个实施方式中,抗PD-1抗体是BGB-A317,纳武单抗(也称之为ONO-4538、BMS-936558或MDX1106)或派姆单抗(也称之为MK-3475、SCH 900475或兰博利珠单抗(lambrolizumab))。在一个实施方式中,抗PD-L1抗体是纳武单抗。纳武单抗是一种人IgG4抗PD-1单克隆抗体,以商品名Opdivo™销售。在另一个实施方式中,抗PD-1抗体是派姆单抗。派姆单抗是一种人源化单克隆IgG4抗体,并以商品名Keytruda™销售。在又一个实施方式中,抗PD-1抗体是CT-011,一种人源化抗体。单独给予的CT-011未能在治疗复发的急性髓性白血病(AML)中显示出反应。在又一实施方式中,抗PD-1抗体是AMP-224,一种融合蛋白。在另一实施方式中,PD-1抗体是BGB-A317。BGB-A317是一种单克隆抗体,其中结合Fcγ受体I的能力被专门设计出来,并且具有与PD-1的独特结合特征,具有高亲和力和卓越的靶标特异性。

[0492] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是PD-L1抑制剂。在一个实施方式中,PD-L1抑制剂是抗PD-L1抗体。在一个实施方式中,抗PD-L1抗体是MEDI4736(度伐鲁单抗(durvalumab))。在另一实施方式中,抗PD-L1抗体是BMS-936559(也称为MDX-1105-01)。在另一实施方式中,PD-L1抑制剂是阿特朱单抗(也称为MPDL3280A和Tecentriq®)。

[0493] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是PD-L2抑制剂。在一个实施方式中,PD-L2抑制剂是抗PD-L2抗体。在一个实施方式中,抗PD-L2抗体是rHIgM12B7A。

[0494] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)抑制剂。在一个实施方式中,LAG-3抑制剂是IMP321,一种可溶性Ig融合蛋白(Brignone等,J.Immunol.,2007,179,4202-4211)。在一个实施方式中,LAG-3抑制剂是BMS-986016。

[0495] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是B7抑制剂。在一个实施方式中,B7抑制剂是B7-H3抑制剂或B7-H4抑制剂。在一个实施方式中,B7-H3抑制剂是MGA271,一种抗B7-H3抗体(Loo等,Clin.Cancer Res.,2012,3834)。

[0496] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是TIM3(T-细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3)抑制剂(Fourcade等,J.Exp.Med.,2010,207,2175-86;Sakuishi等,J.Exp.Med.,2010,207,2187-94)。

[0497] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是OX40(CD134)激动剂。在一个实施方式中,检查点抑制剂是抗OX40抗体。在一个实施方式中,抗OX40抗体是抗OX-40。在另一个实施方式中,抗OX40抗体是MEDI6469。

[0498] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是GITR激动剂。在一个实施方式中,检查点抑制剂是抗GITR抗体。在一个实施方式中,抗GITR抗体是TRX518。

[0499] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是CD137激动剂。。在一个实施方式中,检查点抑制剂是抗CD137抗体。在一个实施方式中,抗CD137抗体是乌鲁单抗(urelumab)。在一个实施方式中,抗CD137抗体是PF-05082566。

[0500] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是CD40激动剂。在一个实施方式中,检查点抑制剂是抗CD40抗体。在一个实施方式中,抗CD40抗体是CF-870,893。

[0501] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是重组人白介素-15(rhIL-15)。

[0502] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是IDO抑制剂。在一个实施方式中,IDO抑制剂是INCB024360。在一个实施方式中,IDO抑制剂是吲哚莫德(indoximod)。

[0503] 在某些实施方式中,本文提供的联合疗法包括两种或更多种本文所述的检查点抑制剂(包括相同或不同类别的检查点抑制剂)。此外,本文所述的联合疗法可与本文所述的一种或多种第二活性剂组合使用,其中适用于治疗本文所述的和本领域理解的疾病。

[0504] 在一些实施方式中,在给予本药物组合物之前给予检查点抑制剂。在其他实施方式中,检查点抑制剂与本文提供的药物组合物同时(例如,以相同的给药周期)给予。在其他实施方式中,在给予本文提供的药物组合物之后给予检查点抑制剂。

[0505] 在一些实施方式中,检查点抑制剂的量可以通过标准临床技术确定。

[0506] 可以给予人这样的检查点抑制剂剂量用于预防和/或治疗癌症,所述免疫检查点抑制剂剂量导致约0.1μg/ml-约450μg/ml的血清效价,并且在一些实施方式中,为至少0.1μg/ml、至少0.2μg/ml、至少0.4μg/ml、至少0.5μg/ml、至少0.6μg/ml、至少0.8μg/ml、至少1μg/ml、至少1.5μg/ml,such as at least 2μg/ml、至少5μg/ml、至少10μg/ml、至少15μg/ml、至少20μg/ml、至少25μg/ml、至少30μg/ml、至少35μg/ml、至少40μg/ml、至少50μg/ml、至少75μg/ml、至少100μg/ml、至少125μg/ml、至少150μg/ml、至少200μg/ml、至少250μg/ml、至少300μg/ml、至少350μg/ml、至少400μg/ml或至少450μg/ml。应当理解的是,检查点抑制剂将采用的精确剂量还将取决于给药途径和对象癌症的严重程度,并且应根据从业者的判断和各个患者的情况来决定。

[0507] 在一些实施方式中,给予患者的检查点抑制剂(例如,PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂)的剂量通常为对象体重的0.1mg/kg-100mg/kg。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约1mg/kg-约75mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为1mg/kg-20mg/kg对象体重,诸如1mg/kg-5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约1mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约1.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约2mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约2.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约3mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约3.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约4mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约4.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约5.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约6mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约6.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约7mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约7.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约8mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约8.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约9.0mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约10.0mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约15.0mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约20.0mg/kg对象体重。

[0508] 在一些实施方式中,本文提供的药物组合物以密封的容器内的干燥的冻干粉末或

无水浓缩物提供并可以经重建,例如,用水或盐水,至对于给予对象合适的浓度。在某些实施方式中,抗体药物偶联物以密封容器内下述单位剂型的干燥的冻干的粉末或无水浓缩物提供:至少0.1mg、至少0.5mg、至少1mg、至少2mg或至少3mg,如至少5mg、至少10mg、至少15mg、至少25mg、至少30mg、至少35mg、至少45mg、至少50mg、至少60mg、至少75mg、至少80mg、至少85mg、至少90mg、至少95mg或至少100mg。冻干的抗体药物偶联物可以2-8℃储存于其原始容器内,而抗体药物练武可以在重建后12小时内给予,诸如6小时内,5小时内、3小时内或1小时内。在另一实施方式中,包含本文提供的抗体药物偶联物的药物组合物以密封容器中的液体形式提供,指明抗体药物偶联物的浓度和量。在某些实施方式中,抗体药物偶联物的液体形式在密封容器这样提供:至少0.1mg/ml、至少0.5mg/ml或至少1mg/ml,并且如至少5mg/ml、至少10mg/ml、至少15mg/ml、至少25mg/ml、至少30mg/ml、至少40mg/ml、至少50mg/ml、至少60mg/ml、至少70mg/ml、至少80mg/ml、至少90mg/ml或至少100mg/ml。

[0509] 在一些实施方式中,将在预防和/或治疗癌症中有效的本文所提供的预防性或治疗性试剂(例如,本文所提供的抗体药物偶联物)或组合物的量可以通过标准临床技术确定。

[0510] 因此,可以给予人这样的药物组合物中抗体药物偶联物的剂量用于预防和/或治疗癌症,所述药物组合物中抗体药物偶联物的剂量导致约0.1μg/ml-约450μg/ml的血清效价,并且在一些实施方式中,为至少0.1μg/ml、至少0.2μg/ml、至少0.4μg/ml、至少0.5μg/ml、至少0.6μg/ml、至少0.8μg/ml、至少1μg/ml、至少1.5μg/ml,例如至少2μg/ml、至少5μg/ml、至少10μg/ml、至少15μg/ml、至少20μg/ml、至少25μg/ml、至少30μg/ml、至少35μg/ml、至少40μg/ml、至少50μg/ml、至少75μg/ml、至少100μg/ml、至少125μg/ml、至少150μg/ml、至少200μg/ml、至少250μg/ml、至少300μg/ml、至少350μg/ml、至少400μg/ml或至少450μg/ml。应当理解的是,将在制剂中采用的精确剂量还将取决于给药途径和对象癌症的严重程度,并且应根据从业者的判断和各个患者的情况来决定。

[0511] 有效剂量可从体外或动物模型测试系统所得剂量反应曲线外推。

[0512] 对于本文所提供的包含抗体药物偶联物的药物组合物,给予患者的抗体药物偶联物的剂量通常是0.1mg/kg-100mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约1mg/kg-约75mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为1mg/kg-20mg/kg对象体重,诸如1mg/kg-5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约1mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约1.25mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约1.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约2mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约2.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约3mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约3.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约4mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约4.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约5.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约6mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约6.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约7mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约7.5mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约8mg/kg对象体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约8.5mg/kg对象体重。

[0513] 在一些实施方式中,基于患者在基线时的实际体重给予配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物,除非患者的体重从前一周期的基线变化≥10%,或符合剂量调整标准,否则剂量不会改变。在一些实施方式中,除了体重大于100kg的患者之外,将使用实际体重,在这类情况中,将基于100kg的体重计算剂量。在一些实施方式中,接受1.00mg/kg剂量水平的患者的最大剂量为100mg,而接受1.25mg/kg剂量水平的患者的最大剂量为125mg。

[0514] 在一实施方式中,将大约100mg/kg或更少,大约75mg/kg或更少,大约50mg/kg或更少,大约25mg/kg或更少,大约10mg/kg或更少,大约5mg/kg或更少,大约1mg/kg或更少,大约0.5或更少,或大约0.1mg/kg或更少的配制在药物组合物中的抗体药物偶联物给予5次、4次、3次、2次或1次,以治疗癌症。在一些实施方式中,将本文提供的包含抗体药物偶联物的药物组合物给予约1-12次,其中,可以根据医生所确定的需求给予剂量,例如,每周、每双周、每月、每两个月一次、每三个月一次等。在一些实施方式中,较低剂量(例如,0.1-15mg/kg)可以较频繁地给予(例如,3-6次)。在其他实施方式中,较高剂量(例如,25-100mg/kg)可以较不频繁地给予(例如,1-3次)。

[0515] 在一些实施方式中,将配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物的单剂量在一时间段(例如,一年)内以每两周的周期(例如,约14天)给予患者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26次以治疗癌症,其中剂量选自下组:0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg、约100mg/kg或其组合(即,每月剂量的每个剂量可能相同也可能不同)。

[0516] 在一些实施方式中,将配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物的单剂量在一时间段(例如,一年)内以每三周的周期(例如,约14天)给予患者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、21、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26次以治疗癌症,其中剂量选自下组:0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg、约100mg/kg或其组合(即,每月剂量的每个剂量可能相同也可能不同)。

[0517] 在一些实施方式中,将配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物的单剂量在一时间段(例如,一年)内以每四周的周期(例如,约14天)给予患者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、21、15、16、17、18、19、20、28、22、23、24、25或26次以治疗癌症,其中剂量选自下组:0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg、约100mg/kg或其组合(即,每月剂量的每个剂量可能相同也可能不同)。

[0518] 在另一实施方式中,将配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物的单剂

量在一时间段(例如,一年)内以约每个月(例如,约30天)的间隔给予患者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12次以预防癌症,其中,剂量选自下组:约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg、约100mg/kg或其组合(每月剂量的每个剂量可能相同也可能不同)。

[0519] 在另一实施方式中,将配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物的单剂量在一时间段(例如,一年)内以约每两个月(例如,约60天)的间隔给予患者1、2、3、4、5或6次以预防癌症,其中,剂量选自下组:约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg、约100mg/kg或其组合(每月剂量的每个剂量可能相同也可能不同)。

[0520] 在另一实施方式中,将配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物的单剂量在一时间段(例如,一年)内以约每三个月(例如,约120天)的间隔给予患者1、2、3或4次以预防癌症,其中,剂量选自下组:约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg、约100mg/kg或其组合(每月剂量的每个剂量可能相同也可能不同)。

[0521] 在某些实施方式中,用于向患者提供本文配制在本文提供的药物组合物中的抗体药物偶联物的剂量的给药途径是鼻内、肌肉内、静脉内或其组合,但是也可以接受本文所述的其他途径。各剂量可以或者可以不通过相同的给药途径给予。在一些实施方式中,在本文提供的药物组合物中配制的抗体药物偶联物可以通过多种给药途径给予,其与一种或多种其他治疗剂的其它剂量同时或随后。

[0522] 在一些更具体的实施方式中,在本文提供的药物组合物中配制的抗体药物偶联物以约1mg/kg、约1.25mg/kg或约1.5mg/kg对象体重的剂量通过静脉内(IV)注射或输注给予。

[0523] 在一些更具体的实施方式中,在本文提供的药物组合物中配制的抗体药物偶联物以约1mg/kg、约1.25mg/kg或约1.5mg/kg对象体重的剂量在约30分子内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每三周周期两次。在一些实施方式中,配制在药物组合物中的抗体药物偶联物在约30分钟内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每三周周期的第1天和第8天。在一些实施方式中,所述方法进一步包括通过静脉内(IV)注射或输注给予免疫检查点抑制剂,每三周周期一次或多次。在一些实施方式中,所述方法进一步包括通过静脉内(IV)注射或输注给予免疫检查点抑制剂,每三周周期的第1天。在一些实施方式中,免疫检查点抑制剂是派姆单抗,并且其中派姆单抗在约30分钟内以约200mg的量给予。在其它些实施方式中,免疫检查点抑制剂是阿特珠单抗,并且其中阿特珠单抗在约60分钟或30分钟内以约1200mg的量给予。在一些实施方式中,将抗体药物偶联物给予在用免疫检查点抑制剂治疗期间或之后显示疾病进展或复发的转移性尿路上皮癌患者。在一些实施方式中,将抗体药物偶联物给

予在用免疫检查点抑制剂治疗期间或之后显示疾病进展或复发的尿路上皮癌患者。

[0524] 在其它更具体的实施方式中,在本文提供的药物组合物中配制的抗体药物偶联物以约1mg/kg、约1.25mg/kg或约1.5mg/kg对象体重的剂量在约30分子内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每四周周期三次。在一些实施方式中,配制在药物组合物中的抗体药物偶联物在约30分钟内通过静脉内(IV)注射或输注给予,每四周周期的第1天、第8天和第15天。在一些实施方式中,所述方法进一步包括通过静脉内(IV)注射或输注给予免疫检查点抑制剂,每四周周期一次或多次。在一些实施方式中,免疫检查点抑制剂是派姆单抗。在其它实施方式中,免疫检查点抑制剂是阿特珠单抗。在一些实施方式中,将抗体药物偶联物给予在用免疫检查点抑制剂治疗期间或之后显示疾病进展或复发的转移性尿路上皮癌患者。在一些实施方式中,将抗体药物偶联物给予在用免疫检查点抑制剂治疗期间或之后显示疾病进展或复发的尿路上皮癌患者。

[0525] 为了简洁起见,本文使用某些缩写。一个示例是代表氨基酸残基的单字母缩写氨基酸及其对应的三字母和单字母缩写如下。

[0526]	丙氨酸	Ala	(A)
[0527]	精氨酸	Arg	(R)
[0528]	天冬酰胺	Asn	(N)
[0529]	天冬氨酸	Asp	(D)
[0530]	半胱氨酸	Cys	(C)
[0531]	谷氨酸	Glu	(E)
[0532]	谷氨酰胺	Gln	(Q)
[0533]	甘氨酸	Gly	(G)
[0534]	组氨酸	His	(H)
[0535]	异亮氨酸	Ile	(I)
[0536]	亮氨酸	Leu	(L)
[0537]	赖氨酸	Lys	(K)
[0538]	甲硫氨酸	Met	(M)
[0539]	苯丙氨酸	Phe	(F)
[0540]	脯氨酸	Pro	(P)
[0541]	丝氨酸	Ser	(S)
[0542]	苏氨酸	Thr	(T)
[0543]	色氨酸	Trp	(W)
[0544]	酪氨酸	Tyr	(Y)
[0545]	缬氨酸	Val	(V)

[0546] 使用肯定的语言来描述多个实施方式,本发明在本文中大体上公开。本发明还具体包括其中全部或部分排除特定主题的实施方式,例如物质或材料、方法步骤和条件、方案、程序、测定或分析。因此,即使本发明通常不就本发明不包括的内容在本文中表达,但是未明确包括在本发明中的方面仍然在本文中公开。

[0547] 本文描述了本发明的特定实施方式,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳方式。在阅读前述描述后,公开的实施方式的变体对于本领域的工作人员而言成为显而易见

的,并且预期本领域技术人员可以适当地采用这类变体。因此,本发明旨在以不同于本文具体描述的方式实施,并且本发明包括适用法律允许的所附权利要求中记载的主题的所有修改和等同物。而且,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述元素在其所有可能的变化中的任何组合。

[0548] 本说明书引用的所有出版物、专利申请、登录号和其他参考文献通过引用其全部内容纳入本文,就好像各发表物或专利申请特定和单独地通过引用纳入本文那样。提供本文讨论的出版物仅针对其在本申请提交日之前的公开。本文中所有内容均不应解释为承认本发明不能凭借在先发明而先于这些出版物。此外,所提供的出版日期可能与实际公开日期不同,这可能需要单独确认。

[0549] 描述了本发明的许多实施方式。然而,应理解,可进行各种改进而不背离本发明的精神和范围。因此,实验部分中的描述旨在说明但不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0550] 6.实施例

[0551] 以下是对用于研究的各种方法和材料的描述,并且提出的目的是为本领域普通技术人员提供如何制作和使用本发明的完整公开和描述,并不旨在限制发明人认为的发明范围,也不旨在表示进行了下述实验并且是所进行的所有实验。应当理解的是,并不一定以现在时书写示例性描述,而是可以进行这些描述以生成与本发明的教导相关联的数据等。努力保证所用数值(如量、温度等)的准确性,但应允许一些实验误差和偏差。

[0552] 6.1实施例1-pH和缓冲液筛选

[0553] AGS-22M6E在14种候选缓冲液(全部为20mM,如下表1中详述)中以10mg/mL配制。评估使用用柠檬酸滴定至pH 5.2和5.7的20mM柠檬酸钠缓冲液,以及用HCl滴定至pH5.5、6.0和6.5的20mM组氨酸缓冲液的制剂。此外,在组氨酸缓冲系统中评估了三种不同的阴离子——氯离子、磷酸根和琥珀酸根。液体制剂经历40℃储存温度条件2周,室温(RT)搅拌24小时和冻融循环(在-70℃下冷冻并在20℃-25℃下解冻1、3和10个循环)。

[0554] 表1

[0555]

制剂编号	缓冲液	pH	海藻糖二水合物(%)	蔗糖(%)	吐温20浓度(w/v%)
F1	20mM 柠檬酸钠/柠檬酸	5.2	5.5	0	0.02
F2		5.7			
F3	20mM 组氨酸/HCl	5.5			
F4		6			
F5		6.5			
F6	20mM柠檬酸钠/柠檬酸	5.2	0	5	
F7		5.7			
F8	20mM 组氨酸/HCl	5.5			
F9		6			

[0556]

F10		6.5			
F11	20mM 组氨酸/磷酸	5.5	5.5	0	
F12		6			
F13	20mM 组氨酸/琥珀酸	5.5			
F14		6			

[0557] 注意:5%蔗糖(m.wt.342)=146mM;5.5%海藻糖二水合物(m.wt.378)=146mM。

[0558] 制剂制备和研究涉及在下面更详细地描述。

[0559] 用于制剂研究的蛋白质产物

[0560] 冷冻接收四管,各管含有约50ml AGS-22M6E(批次号AGS22M6-VCE-02),总共约2.5克。AGS-22M6E在含有5%蔗糖和0.02%聚山梨酯-20的20mM组氨酸pH 6.0缓冲液中为12.5mg/mL。该材料在-70℃下储存直至使用。

[0561] 制剂缓冲液的制备

[0562] 包括柠檬酸(0.1M)、柠檬酸钠(0.1M)和L-组氨酸(0.2M)、琥珀酸(0.25M)、海藻糖二水合物(40%)、蔗糖(40%)、盐酸(2M)和磷酸(2M)的储液根据下表2制备:

[0563] 表2

[0564]

储液	MW (g/mol)	所需浓度 (mol/L)	体积	需要的质量 (g)
柠檬酸单水合物	210.14	0.1	1.0	21.01
柠檬酸钠二水合物	294.1	0.1	2.0	58.82
L-组氨酸	155.15	0.2	1.5	46.55
海藻糖二水合物	378.33	40%	1.5	600.00
蔗糖	342.30	40%	1.0	400.00
琥珀酸	118.09	0.25	0.8	23.62

[0565]

				以测量出	
储液	初始浓度 (M)	最终浓度 (M)	最终体积 (mL)	浓酸 (mL)	水 (mL)
盐酸	12.1	2.0	500	82.6	417.4
磷酸	14.8	2.0	500	67.6	432.4

[0566] 根据上表称量试剂。添加适当体积的Milli-Q水以溶解试剂。溶液通过0.22um过滤器过滤。

[0567] 透析用制剂缓冲液的制备

[0568] 根据下表3制备1.0L各种制剂用于透析和安慰剂小瓶分装:

[0569] 表3

[0570]

制剂	pH	0.1 M 柠檬酸一水合物 (mL)	0.1 M 柠檬酸钠二水合物 (mL)	0.2 M L-组氨酸 (mL)	40% 海藻糖二水合物 (mL)	40% 蔗糖 (mL)	水 (mL)	pH调整	总体积 (mL)
F1	5.2	61	139		137.5		662.5		1000
F2	5.7	37	163		137.5		662.5		1000
F3	5.5			100	137.5		762.5	2M HCl	1000
F4	6.0			100	137.5		762.5	2M HCl	1000
F5	6.5			100	137.5		762.5	2M HCl	1000
F6	5.2	61	139			125	675		1000
F7	5.7	37	163			125	675		1000
F8	5.5			100		125	775	2M HCl	1000
F9	6.0			100		125	775	2M HCl	1000
F10	6.5			100		125	775	2M HCl	1000
F11	5.5			100	137.5		762.5	2M 磷酸	1000
F12	6.0			100	137.5		762.5	2M 磷酸	1000
F13	5.5			100	137.5		762.5	0.25M 琥珀酸	1000
F14	6.0			100	137.5		762.5	0.25M 琥珀酸	1000

[0571] 用合适的酸将pH值调节至目标pH值±0.1。缓冲液在4℃下储存直至使用。

[0572] 制剂制备

[0573] 在室温水浴中解冻各自含有50ml AGS-22M6E(批次号AGS22M6-VCE-02)的4个管,然后在250ml瓶中合并。为各个制剂分配11ml并添加到透析盒中。将盒置于含有约40倍过量制剂缓冲液的烧杯中,并在2-8℃下搅拌过夜。弃去缓冲液并添加新鲜缓冲液并在2-8℃下搅拌过夜。从盒中移出材料并转移到50ml管中,确定浓度并用相应的制剂缓冲液调整体积,使最终浓度为10mg/ml。安慰剂是用于配制产品的相应缓冲液。

[0574] 制剂装瓶和加塞

[0575] 在BakerSG600层流罩中进行无菌过滤和填充。使用无菌技术(Millipore Millex-GV 0.22μm PVDF注射器过滤器,#SLGV033RS)对制剂和安慰剂进行无菌过滤。将无菌加塞的小瓶(Hollister-Stier 2-ml无菌加塞的小瓶,#7505ZA)在罩子中去除卷边(decrimp),并使用无菌技术移除塞子。小瓶填充有1.0ml配制的产物或安慰剂,然后重新加塞。

[0576] 材料要求和样图(map)

[0577] 材料要求和样图如下

[0578] 表4

[0579]

浓度(mg/mL)	条件	小瓶的数量	填充体积	总填充体积	总蛋白质(mg)	各制剂的总ml	各制剂的总mg
10	40°C	5	1	5.0	50		
10	1循环Fz/Th，在-70 °C /25°C	1	1	1.0	10		
10	3循环Fz/Th，在-70 °C /25°C	1	1	1.0	10		
10	10循环Fz/Th，在-70 °C /25°C	1	1	1.0	10		
10	吐温20试验	1	1	1.0	10		
10	RT振荡24小时	1	1	1.0	10	10	100

[0580]

要测试的蛋白质浓度(ProtConcs)的数量	测试的缓冲液的数量	小瓶总数	总填充体积（mL）	小瓶中的蛋白质(mg)	需要的蛋白质(mg)
1	14	140	140.0	1400	**1680**

总样品数量:112

[0581]

条件	在储存条件下的天数			
	0	**3**	**7**	**14**
40°C	X	X	X	X
1循环Fz/Th，在-70< C/25< C		X		
3循环Fz/Th，在-70< C/25< C			X	
10循环Fz/Th，在-70< C/25< C				X
RT振荡24小时	X			

[0582] 时间点和试验

[0583] 时间点和试验如下表5所示。

[0584] 表5

[0585]

分析试验	T=0	T=3d	T=7d	T=14d	1 X Fz/Th于-70°C /25°C	3 XFz/Th于-70°C /25°C	10 XFz/Th于-70°C /25°C	RT振荡24小时
	13-4月-10	16-4月-10	20-4月-10	4/272010				
pH	X	X						
渗透压	X	X						
视觉外观	X	X	X	X	X	X	X	X
A280	X	X	X	X	X	X	X	X
浊度 (A330)	X	X	X	X	X	X	X	X
非还原SDS-PAGE	X	X	X	X	X	X	X	X
还原SDS- PAGE	X	X	X	X	X	X	X	X
SE-HPLC	X	X	X	X	X	X	X	X
RP-HPLC	X			X				
效力和CIEF*	提供样品用于测试							

[0586] 液体制剂40℃稳定性研究设计

[0587] 制剂和安慰剂小瓶竖直放置在设定为40℃的培养箱中。在各时间点,根据样图由储存条件移出各制剂的一个活性物小瓶和一个安慰剂小瓶。样品在-70℃下冷冻,并在研究结束时进行分批分析。在分析之前,样品在室温下解冻。在通过0.22um过滤器过滤后,将各个样品的3等分试样组(各样品70uL等分试样)冷冻在-70℃。分析测试后,任何剩余的材料都在2-8℃下储存过夜,以防需要重新测试。在所有试验完成后,剩余的材料然后储存在-70℃。2个冷冻等分试样用于cIEF和效力试验。

[0588] 冻融(-70℃)稳定性研究设计

[0589] 将各制剂的一个小瓶(1.0mL填充)竖直放置在-70℃冰箱中至少4小时,其允许冷冻。为了解冻,将各个小瓶由储存中移出并在室温下解冻直到不再观察到冰,然后轻轻旋转小瓶。这构成了一个完整的冻融循环。各个测试的制剂样品小瓶完成1、3和10个冻融循环。在最后的冻融循环之后,通过分析测试来评估所有样品。将各个样品的3等分试样组(各样品70uL等分试样)立即冷冻在-70℃。分析测试后,任何剩余的材料都在2-8℃下储存过夜,以防需要重新测试。在所有试验完成后,剩余的材料储存在-70℃。2个冷冻等分试样用于cIEF和效力试验。

[0590] 搅拌研究设计

[0591] 各制剂的一个小瓶被竖直固定在标准冷冻箱中。然后将盒子连接到IKA-VIBRAMAX-VXR定轨振荡器上,在室温下设置为500rpm,运行24小时。然后取出样品并储存在-70℃直至分析。

[0592] 制剂标准

[0593] 取1.2mL的AGS-22M6E(批次号AGS22M6-VCE-02)起始材料(12.5mg/mL,在含有5%蔗糖和0.02%聚山梨酯-20的20mM组氨酸pH 6.0缓冲液中),并等分至200ul/小瓶,然后储存在-70℃,作为本研究的制剂标准。

[0594] 视觉外观、A280(蛋白质浓度和药物加载)、A330(浊度)、SE-HPLC、非还原和还原的SDS-PAGE、RP-HPLC-NPI.iCIEF和效力用于评估AGS-22M6E的稳定性。

[0595] 视觉外观:在研究过程中,所有样品均未显示出颜色、混浊和颗粒。即使振荡也未见颗粒。

[0596] A280(蛋白质浓度)分析:A280分析的结果显示在下表6中。

[0597] 表6

[0598]

样品	A280			
	在40℃下的天数			
	0	3	7	14
F1	0.6549	0.6274	0.6805	0.6449
F2	0.6818	0.7017	0.6929	0.6853
F3	0.7069	0.6491	0.7130	0.6990
F4	0.7056	0.7147	0.7106	0.7217
F5	0.7123	0.6837	0.7138	0.7201
F6	0.6616	0.6789	0.6935	0.6830
F7	0.6594	0.6558	0.6672	0.6730
F8	0.6986	0.6903	0.7037	0.7017
F9	0.6834	0.7002	0.7063	0.7061
F10	0.6888	0.6839	0.6937	0.7023
F11	0.7032	0.7109	0.7074	0.6950
F12	0.7040	0.6622	0.7088	0.7255
F13	0.6736	0.6754	0.6874	0.6818
F14	0.6944	0.6745	0.6878	0.7003

[0599]

样品	A280				
	0	1X FzTh	3X FzTh	10X FzTh	24小时振荡
F1	0.6549	0.6582	0.6951	0.65725	0.66017
F2	0.6818	0.6809	0.6761	0.68321	0.67565
F3	0.7069	0.6963	0.6958	0.69771	0.70847
F4	0.7056	0.7048	0.6817	0.69875	0.68629
F5	0.7123	0.7027	0.6961	0.70278	0.71533
F6	0.6616	0.6651	0.6715	0.68515	0.66747
F7	0.6594	0.6622	0.6585	0.63399	0.65046
F8	0.6986	0.6969	0.7042	0.69579	0.69878
F9	0.6834	0.6893	0.6876	0.67558	0.69247
F10	0.6888	0.6862	0.6921	0.68071	0.68312
F11	0.7032	0.6967	0.6905	0.68287	0.70169
F12	0.7040	0.6892	0.7064	0.69924	0.68928
F13	0.6736	0.6746	0.6745	0.65992	0.66715
F14	0.6944	0.6831	0.7003	0.67608	0.68892

[0600]

样品	浓度 (mg/mL)			
	40℃下天数			
	0	3	7	14
F1	9.01	8.63	9.36	8.87
F2	9.38	9.65	9.53	9.43
F3	9.72	8.93	9.81	9.62
F4	9.71	9.83	9.77	9.93
F5	9.80	9.40	9.82	9.90
F6	9.10	9.34	9.54	9.40
F7	9.07	9.02	9.18	9.26
F8	9.61	9.50	9.68	9.65
F9	9.40	9.63	9.71	9.71
F10	9.47	9.41	9.54	9.66
F11	9.67	9.78	9.73	9.56
F12	9.68	9.11	9.75	9.98
F13	9.27	9.29	9.46	9.38
F14	9.55	9.28	9.46	9.63

[0601]

样品	浓度 (mg/mL)				
	0	1X FzTh	3X FzTh	10X FzTh	24小时振荡
F1	9.01	9.05	9.56	9.04	9.08
F2	9.38	9.37	9.30	9.40	9.29
F3	9.72	9.58	9.57	9.60	9.75
F4	9.71	9.69	9.38	9.61	9.44
F5	9.80	9.67	9.57	9.67	9.84
F6	9.10	9.15	9.24	9.42	9.18
F7	9.07	9.11	9.06	8.72	8.95
F8	9.61	9.59	9.69	9.57	9.61
F9	9.40	9.48	9.46	9.29	9.53
F10	9.47	9.44	9.52	9.36	9.40
F11	9.67	9.58	9.50	9.39	9.65
F12	9.68	9.48	9.72	9.62	9.48
F13	9.27	9.28	9.28	9.08	9.18
F14	9.55	9.40	9.63	9.30	9.48

[0602] 如图所示,未观察到蛋白质浓度的变化。

[0603] A330(浊度)分析:A330分析的结果显示在下表7中。

[0604] 表7

[0605]

样品	A330					
	40°C下的天数					
	0		3	7	14	
	安慰剂	活性物	活性物	活性物	安慰剂	活性物
F1	-0.0006	0.0591	0.1030	0.1053	0.0131	0.1223
F2	-0.0040	0.0727	0.0934	0.1067	0.0363	0.1070
F3	-0.0063	0.0585	0.0632	0.0715	0.0018	0.0736
F4	-0.0036	0.0601	0.0667	0.0730	0.0053	0.0757
F5	0.0027	0.0659	0.0720	0.0917	0.0030	0.0823
F6	0.0028	0.1018	0.0970	0.1196	0.0004	0.1269
F7	0.0029	0.0705	0.0885	0.0925	0.0073	0.1031
F8	0.0019	0.0620	0.0598	0.0801	0.0112	0.0860
F9	0.0041	0.0681	0.0776	0.0982	0.0193	0.1046
F10	0.0013	0.0628	0.0760	0.0905	0.0156	0.0886
F11	0.0036	0.0773	0.0649	0.0722	0.0100	0.0782
F12	0.0014	0.0652	0.0641	0.0861	0.0131	0.0796
F13	0.0142	0.0655	0.0660	0.0708	0.0121	0.0936
F14	0.0112	0.0659	0.0637	0.0701	0.0122	0.0857

[0606]

样品	A330					
	1X FzTh	3X FzTh	10X FzTh		24小时振荡	
	活性物	活性物	安慰剂	活性物	安慰剂	活性物
F1	0.0638	0.0787	0.0042	0.0755	0.0083	0.0698
F2	0.0683	0.0757	0.0075	0.0774	0.0089	0.0719
F3	0.0631	0.0645	0.0008	0.0620	0.0235	0.0669
F4	0.0593	0.0908	0.0005	0.0600	0.0036	0.0577
F5	0.0647	0.0598	0.0049	0.0685	0.0099	0.0615
F6	0.0805	0.0796	-0.0001	0.0728	0.0180	0.0737
F7	0.0714	0.0777	0.0025	0.0745	0.0100	0.0695
F8	0.0630	0.0750	0.0006	0.0696	0.0053	0.0568
F9	0.0670	0.0737	0.0034	0.0715	0.0022	0.0692
F10	0.0595	0.0750	0.0007	0.0752	0.0050	0.0676
F11	0.0559	0.0763	0.0016	0.0694	0.0013	0.0629
F12	0.0625	0.0679	0.0006	0.0695	0.0028	0.0695
F13	0.0616	0.0701	0.0028	0.0820	-0.0009	0.0759
F14	0.0611	0.0745	-0.0017	0.1033	0.0108	0.0972

[0607] 如图所示,制剂F1和F6随着时间推移表现出最显著的浊度增加。在T＝0时,制剂F6的浊度较高,这在其他制剂中未观察到。

[0608] SDS-PAGE分析:SDS-PAGE分析的结果在图1A、图1B、图1C和图1D中显示。14天后,通过F1和F6中的还原SDS-PAGE观察到微小低分子量(LMW)带(约35kD)。在非还原SDS-PAGE分析中,F1、F2、F6和F7还显示出之前在T＝0时不存在的微小高分子量(HMW)带(约200kD)。

[0609] RP-HPLC分析:表8和图1E显示了RP-HPLC分析的结果。对于任何制剂,在t＝0时通过RP-HPLC未检测到游离的SGD1010(药物MMAE的痕量裂解),然而在40℃下14天后,注意到SGD1010(范围为0.17-1.59uM)并且其在较高pH值下对于组氨酸比柠檬酸盐制剂略微更快,其中组氨酸/琥珀酸的表现略好于组氨酸/磷酸和组氨酸/HCl。

[0610] 表8

[0611]

制剂编号	缓冲液	pH	海藻糖二水合物(%)	蔗糖(%)	区域	μM SGD1010
F1	20mM 柠檬酸钠/柠檬酸	5.2	5.5	0	0	0.00
					28	0.17
F2		5.7			0	0.00
					31	0.18
F3	20mM 组氨酸/HCl	5.5			0	0.00
					101	0.60
F4		6			0	0.00
					127	0.76
F5		6.5			0	0.00
					136	0.81
F6	20mM 柠檬酸钠/柠檬酸	5.2	0	5	0	0.00
					30	0.18
F7		5.7			0	0.00
					34	0.20
F8	20mM 组氨酸/HCl	5.5			0	0.00
					96	0.57
F9		6			0	0.00
					267	1.59
F10		6.5			0	0.00
					124	0.74
F11	20mM 组氨酸/ 磷酸	5.5	5.5	0	0	0.00
					111	0.66
F12		6			0	0.00
					135	0.80
F13	20mM 组氨酸/琥珀酸	5.5			0	0.00
					89	0.53
F14		6			0	0.00
					106	0.63

[0612] SE-HPLC分析:如下表9和图1F、图1G和图1H所示,通过SE-HPLC,所有制剂在pH5.2-5.7下的HMW聚集物水平显著增加,其中柠檬酸盐制剂在相应pH下显示出比组氨酸更多的聚集物。在相似的pH值下,柠檬酸盐显示出比组氨酸更多的聚集体。pH 6.0的组氨酸制剂比pH 5.5和pH 6.5的组氨酸制剂表现出更好的稳定性。在海藻糖和蔗糖之间没有观察到差异。

[0613] 表9

[0614]

			总整合面积%			整合面积			
制剂	40° C下的天数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
1	0	19.5	1.8	96.5	1.7	83	4500	79	4661
	3	19.5	36.8	61.9	1.3	1812	3050	63	4924
	7	19.6	40.1	58.3	1.5	1953	2839	73	4866
	14	19.6	43.1	55.5	1.4	2095	2696	68	4858
2	0	19.5	1.8	96.6	1.6	93	4936	83	5112
	3	19.6	18.5	79.9	1.6	889	3832	77	4797
	7	19.6	24.3	74.0	1.7	1299	3949	90	5338
	14	19.6	29.4	68.6	1.9	1442	3363	95	4901
3	0	19.5	1.6	96.7	1.7	82	5078	89	5249
	3	19.5	5.0	90.8	4.2	253	4603	211	5067
	7	19.5	5.5	91.0	3.5	268	4463	171	4903
	14	19.5	6.5	91.0	2.5	311	4333	120	4764
4	0	19.5	1.7	96.5	1.8	81	4636	85	4802
	3	19.5	3.1	95.1	1.8	149	4571	87	4808
	7	19.5	3.9	93.9	2.2	201	4797	110	5108
	14	19.5	6.3	90.5	3.2	314	4536	162	5012
5	0	19.5	1.6	96.8	1.6	85	4991	82	5158
	3	19.5	3.5	94.6	1.9	167	4534	92	4793
	7	19.5	5.5	90.5	4.0	282	4622	206	5109
	14	19.5	6.3	91.4	2.3	308	4430	110	4847

[0615]

			总整合面积%			整合面积			
制剂	40° C下的天数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
6	0	19.5	2.2	95.8	2.0	97	4242	88	4427
	3	19.6	35.6	63.0	1.4	1754	3100	68	4921
	7	19.6	38.9	59.5	1.6	1908	2915	78	4902
	14	19.6	41.6	56.5	1.9	2047	2783	96	4926
7	0	19.5	1.8	96.7	1.6	89	4867	78	5034
	3	19.6	18.6	79.8	1.7	906	3895	81	4882
	7	19.6	24.2	74.2	1.7	1145	3515	78	4739
	14	19.6	28.5	69.6	1.9	1360	3318	90	4768
8	0	19.5	1.6	96.4	2.0	82	4968	104	5154
	3	19.5	3.9	94.1	1.9	184	4421	91	4696
	7	19.5	5.4	92.2	2.4	259	4388	113	4760
	14	19.5	6.7	90.8	2.5	322	4343	119	4785
9	0	19.6	1.2	96.5	2.3	60	4987	121	5168
	3	19.5	3.3	94.6	2.1	158	4504	98	4760
	7	19.5	4.2	93.6	2.3	209	4659	113	4981
	14	19.5	5.2	92.1	2.7	249	4408	130	4787
10	0	19.5	1.6	96.7	1.7	82	4914	85	5081
	3	19.5	3.4	94.8	1.9	155	4387	87	4629
	7	19.5	4.8	92.9	2.3	229	4466	111	4807
	14	19.5	5.9	91.5	2.6	276	4312	122	4710

[0616]

			总整合面积%			整合面积			
制剂	40° C下的天数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
11	0	19.5	1.6	96.8	1.6	82	4989	83	5154
	3	19.5	3.6	94.4	2.0	168	4415	93	4676
	7	19.5	5.3	92.5	2.2	250	4400	106	4756
	14	19.6	12.9	84.8	2.3	625	4107	111	4843
12	0	19.6	1.7	96.4	1.8	97	5340	101	5538
	3	19.5	3.3	94.7	1.9	159	4504	92	4755
	7	19.5	4.3	93.6	2.1	214	4637	104	4955
	14	19.5	6.3	89.7	4.0	319	4538	204	5060
13	0	19.5	1.9	96.7	1.7	93	4806	84	4969
	3	19.5	7.1	91.0	1.9	326	4184	86	4596
	7	19.5	9.8	88.1	2.1	456	4083	97	4636
	14	19.5	12.6	85.0	2.4	598	4041	114	4753
14	0	19.5	1.6	96.6	1.7	82	4834	86	5002
	3	19.5	4.5	93.6	1.9	204	4265	88	4557
	7	19.5	5.7	92.2	2.2	267	4342	102	4711
	14	19.5	6.9	89.7	3.3	349	4503	167	5018

[0617] 在室温下振荡24小时后或在1、3和10个冻融循环后,在制剂之间没有观察到任何显著的变化(数据未在本文显示),如A330、SDS-PAGE和SE-HPLC所证明。这保证了制剂研究样品可以在不同的时间点提取并储存在-70℃。

[0618] 基于由该研究获得的结果,在所测试的14种制剂中选择制剂F4、F9和F14作为最佳,并因此将其选择作将在后续研究中进一步评估的3种制剂。

[0619] 6.2实施例2-原料药物质(BDS)冻融和振荡研究

[0620] 制剂F4、F9和F14如上文第6.1部分所述制备。制剂F4、F9和F14各自在-20℃和-70℃下经受1、3和10个循环的冷冻,然后在20℃-25℃之间解冻。通过目检、浓度(A280)测量、浊度(A330)测量、SE-HPLC、SDS-PAGE(R&NR)分析样品。对于10个循环的冻融研究,还通过RP-HPLCNPI分析了样品。

[0621] 材料要求和样图如下表10所示。

[0622] 表10

[0623]

浓度(mg/mL)	条件	小瓶数量	填充体积	总填充体积	总蛋白质(mg)
10	T =0	1	3.5	3.5	35
10	1循环Fz/Th，在-20 ℃ /25℃	1	1	1.0	10

[0624]

10	3循环Fz/Th，在-20 ℃ /25℃	1	1	1.0	10
10	10循环Fz/Th，在-20 ℃ /25℃	1	1	1.0	10
10	1循环Fz/Th，在-70 ℃ /25℃	1	1	1.0	10
10	3循环Fz/Th，在-70 ℃ /25℃	1	1	1.0	10
10	10循环Fz/Th，在-70 ℃ /25℃	1	1	1.0	10
10	室温下振荡24小时	1	3.5	3.5	10

[0625]

测试的蛋白质浓度(Prot Concs)数量	测试的缓冲液数量	小瓶数量	填充体积	小瓶中的蛋白质(mg)	需要的蛋白质(mg)
1	3	24	39	390	468

[0626] 注释：

[0627] • 小瓶:5mL无菌螺旋盖聚碳酸酯瓶(Nalgene 5-ml.#3500-05)

[0628] • BDS Fz/Th:1mL填充5mL聚碳酸酯瓶

[0629] • BDS振荡:3.5mL填充5mL聚碳酸酯瓶

[0630] 下表11列出了测定和时间点

[0631] 表11

[0632]

分析试验	T=0	1X Fz/Th，在-70℃ /25℃	3X Fz/Th，在-70℃ /25℃	10X Fz/Th，在-70℃ /25℃	1X Fz/Th，在-20℃ /25℃	3X Fz/Th，在-20℃ /25℃	10X Fz/Th，在20℃ /25℃	室温下振荡24小时
pH	X							
渗透压	X							
视觉外观	X	X	X	X	X	X	X	X
A280	X	X	X	X	X	X	X	X
浊度 (A330)	X	X	X	X	X	X	X	X
非还原SDS- PAGE	X	X	X	X	X	X	X	X
还原SDS-PAGE	X	X	X	X	X	X	X	X
SE-HPLC	X	X	X	X	X	X	X	X
RP-HPLC-NPI	X	X	X	X	X	X	X	X
HIAC	X							X
效力和CIEF	提供样品进行测试							

[0633] 还在室温下对各个制剂进行搅拌研究24小时,并分析所有测试样品的视觉、浓度(A280)、浊度(A330)、SE-HPLC和HIAC。

[0634] 从上述研究中选择的样品也用于iCIEF和效力研究。

[0635] 制剂小瓶和加塞、搅拌研究设计、冻融研究设计和制剂标准如下所述。

[0636] 制剂小瓶分装和加塞

[0637] 在BakerSG600层流罩中进行无菌过滤和填充。使用无菌技术(Millipore Millex-GV 0.22μm PVDF注射器过滤器,#SLGV033RS)对制剂和安慰剂进行无菌过滤。使用带有无菌吸头的5mL电子移液管将过滤后的AGS-22M6E和过滤后的制剂缓冲液(安慰剂)转移到无菌螺旋盖聚碳酸酯瓶(Nalgene5-ml,#3500-05)中。

[0638] 搅拌研究设计

[0639] 各制剂的一个小瓶被竖直固定在标准冷冻箱中。然后将盒子连接到IKA-VIBRAMAX-VXR定轨振荡器上,在室温下设置为500rpm,运行24小时。然后取出样品并储存在70℃直至分析。在通过0.22um过滤器过滤后,将各个样品的3等分试样组(各样品70uL等分试样)冷冻在-70℃。分析测试后,任何剩余的材料都在2-8℃下储存过夜,以防需要重新测试。在所有试验完成后,剩余的材料然后储存在-70℃。2个冷冻等分试样用于cIEF和效力试验。

[0640] 冻融(-70℃和-20℃)稳定性研究设计

[0641] 将各制剂的一个小瓶(1mL填充于5mL聚碳酸酯瓶中)竖直放置在-70℃和-20℃冰箱中至少4小时,其允许冷冻。为了解冻,将各个小瓶由储存中移出并在室温(20-25℃)下解冻,直到不再观察到冰,然后轻轻旋转瓶。这构成了一个完整的冻融循环。各个测试的制剂样品小瓶完成10个冻融循环。在最后的冻融循环之后,通过分析测试来评估所有样品。通过以下方法分析样品。视觉外观、A280/A248、浊度(A330)、SE-HPLC、RP-HPLC-NPI和SDS-PAGE(R&NR)。在通过0.22um过滤器过滤后,将各个样品的3等分试样组(各样品70uL等分试样)冷冻在-70℃。分析测试后,任何剩余的材料都在2-8℃下储存过夜,以防需要重新测试。在所有试验完成后,剩余的材料然后储存在-70℃。2个冷冻等分试样用于cIEF和效力试验。

[0642] 制剂标准

[0643] 取15mL的AGS-22M6E起始材料,为12.8mg/mL,在5.0%蔗糖、0.02%吐温20,pH 6.0中),并等分至500ul/小瓶,然后储存在-70℃,作为本研究的标准。

[0644] 结果

[0645] 视觉外观:在本研究中分析所有样品的视觉外观并且没有看到颗粒,即使在振荡时也是如此。

[0646] A280和A330分析:在本研究中经受不同条件的制剂的A280和A330数据总结在下表12中。如图所示,在任何振荡或冻融条件下,蛋白质浓度都没有变化。此外,在冻融或振荡后浊度没有增加。

[0647] 表12

[0648]

时间点	制剂	稀释因子	A330	A280	A280 (其中安慰剂A280减去)	浓度 (mg/mL)	A330 未稀释
T=0, BDS	4	20	0.012	0.741	0.728	**10.01**	0.083
	9	20	0.021	0.811	0.795	**10.94**	0.091
	14	20	0.004	0.820	0.789	**10.86**	0.103
振荡	4	20	0.011	0.749	0.736	**10.12**	0.089
	9	20	0.027	0.827	0.811	**11.16**	0.960
	14	20	0.001	0.820	0.789	**10.86**	0.107
1X -20C FzTh	4	20	0.006	0.765	0.752	**10.34**	0.097
	9	20	0.026	0.812	0.796	**10.96**	0.098
	14	20	0.005	0.823	0.792	**10.90**	0.112
3X -20C FzTh	4	20	0.003	0.779	0.766	**10.54**	0.096
	9	20	0.030	0.819	0.803	**11.05**	0.098
	14	20	0.003	0.821	0.790	**10.87**	0.108
10X -20C FzTh	4	20	0.001	0.783	0.770	**10.59**	0.097
	9	20	0.031	0.822	0.806	**11.08**	0.109
	14	20	0.008	0.818	0.787	**10.83**	0.128
1X -70C FzTh	4	20	0.002	0.780	0.767	**10.55**	0.114
	9	20	0.028	0.839	0.823	**11.32**	0.120
	14	20	0.001	0.816	0.785	**10.80**	0.108
3X -70C FzTh	4	20	0.004	0.789	0.776	**10.67**	0.095
	9	20	0.031	0.846	0.830	**11.42**	0.097
	14	20	0.003	0.830	0.799	**11.00**	0.107
10X -70C FzTh	4	20	0.006	0.797	0.784	**10.78**	0.091
	9	20	0.031	0.833	0.817	**11.24**	0.090
	14	20	0.002	0.827	0.796	**10.95**	0.093

[0649] SDS-PAGE分析:SDS-PAGE分析的结果示于图2A和2B中。如图所示,对于振荡研究样品和冻融样品,SDS-PAGE没有看到任何变化。还原凝胶和非还原凝胶都与制剂标准相当。

[0650] RP-HPLC分析:对于10个循环的冻融样品,进行RP-HPLC分析。通过RP-HPLC分析,在任何制剂中都没有看到SGD1010峰的迹象(此处未显示数据)。

[0651] SE-HPLC分析:SE-HPLC分析的结果在以下表13中总结。。如图所示,对于3种制剂(F4、F9和14)或安慰剂中的任何一种,在T0以及振荡样品或冻融样品之间没有观察到差异。

[0652] 表13

[0653]

样品名称	条件	总整合面积%				整合面积			
		主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
F4, BDS	T0	19.6	1.3	95.7	3.0	66	4955	154	5175
	室温下振荡24小时	19.5	1.2	96.2	2.6	64	4937	134	5134
	1 F/T -20 °C	19.6	1.2	95.9	2.9	63	4913	150	5125
	3 F/T -20 °C	19.5	1.2	96.1	2.7	63	4960	138	5161
	10 F/T -20 °C	19.5	1.2	96.3	2.4	64	4935	125	5123
	1 F/T -70 °C	19.6	1.2	96.0	2.7	63	4929	141	5132
	3 F/T -70 °C	19.5	1.2	96.2	2.5	64	5006	132	5202
	10 F/T -70 °C	19.6	1.3	95.9	2.8	68	4981	143	5192
F9, BDS	T0	19.6	1.3	95.6	3.1	66	5002	164	5232
	室温下振荡24小时	19.6	1.3	96.4	2.3	65	4980	120	5164
	1 F/T -20 °C	19.5	1.3	95.8	2.9	71	5007	152	5229
	3 F/T -20 °C	19.5	1.2	96.5	2.3	63	4997	119	5179
	10 F/T -20 °C	19.6	1.2	96.1	2.7	64	4944	137	5145
	1 F/T -70 °C	19.6	1.3	96.3	2.4	64	4918	125	5107
	3 F/T -70 °C	19.5	1.2	96.3	2.5	63	4978	127	5168
	10 F/T -70 °C	19.5	1.2	96.1	2.6	65	4996	136	5197
F14, BDS	T0	19.6	1.3	95.7	3.0	72	5190	161	5423
	室温下振荡24小时	19.6	1.3	96.1	2.6	67	5052	138	5256
	1 F/T -20 °C	19.6	1.4	95.7	2.9	74	5090	154	5319
	3 F/T -20 °C	19.5	1.2	96.1	2.7	65	5047	142	5254
	10 F/T -20 °C	19.6	1.3	96.3	2.4	66	5028	127	5221
	1 F/T -70 °C	19.6	1.2	96.4	2.4	66	5106	125	5297
	3 F/T -70 °C	19.5	1.2	96.3	2.4	65	5075	129	5269
	10 F/T -70 °C	19.6	1.3	95.5	3.2	71	5096	169	5336

[0654] 在各研究条件下,分析各种BDS制剂获得的SEC曲线(此处未显示数据)。相较于T=0时的BDS,任何条件下的任何制剂都没有发现差异。

[0655] 下表14总结了BDS样品对于测试的3种制剂各自的HIAC数据。比较室温下振荡24小时之前和之后的样品的结果比较表明,在10μm和25μm之间的范围内的颗粒少于100个,其中所有制剂的25μm范围内的颗粒少于2个。

[0656] 表14

[0657]

			3次运行总累积计数的平均值/mL 大小 (um)						
条件	样品名称	制剂	2	5	7.5	10	15	20	25
无振荡	安慰剂	4	47	10	7	5	5	3	2
		9	73	30	17	8	5	2	0
		14	73	17	12	10	3	0	0
	AGS22M6E	4	382	77	32	15	2	2	0
		9	135	45	28	18	7	0	0

[0658]

室温下振荡24小时		14	365	138	68	47	15	3	2
	安慰剂	4	298	127	78	47	23	3	0
		9	365	155	88	60	13	2	0
		14	407	118	47	25	5	0	0
	AGS22M6E	4	368	127	62	42	18	5	2
		9	557	192	108	73	20	3	2
		14	967	333	165	97	32	12	2

[0659] 制剂F9和F14在搅拌后显示出略微升高的累积计数,其中F4显示了搅拌前和搅拌后的可比性,如图2C所示(10和25um的所有计数均低于USP限制)。

[0660] 总而言之,结果表明所有测试的三种BDS制剂在冻融循环和搅拌处理下都表现出

优异的稳定性,并且通过任何分析方法均未在任何样品中观察到相对于T＝0的变化。

[0661] 6.3实施例3—同时进行的BDS和药品(DP)制剂研究

[0662] 该研究与上文第6.2部分中描述的研究一起进行。用于本研究的制剂组合物和材料与第6.2部分中描述的相同。

[0663] 材料要求和样图如下表所示。

[0664] 表15

[0665]

浓度(mg/mL):	条件	小瓶数量	填充体积	总填充体积	总蛋白质 (mg)	各制剂的总 ml	各制剂的总 mg
10	BDS，在2-8°C	5	1	5.0	50		
10	BDS，在-70°C	6	1	6.0	60		
10	DP，在2-8°C	8	5	40.0	400		
10	DP，在25°C /60%RH	6	5	30.0	300		
10	DP，在40°C /75%RH	6	5	30.0	300	111	1110

测试的蛋白质浓度 (Prot Concs)数量	测试的缓冲液数量	小瓶数量	总填充体积 (mL)	小瓶中的蛋白质 (mg)	需要的蛋白质 (mg)
1	3	93	333	3330	3996

[0666] 材料要求和样图如下表所示。

[0667] 表16

[0668]

分析试验	冻干前	T=0	T=2周	T=4周	T=8周	T=12周
	T=0.1	1-06-10	15-06-10	29-06-10	27-07-10	24-08-10
pH	X	X				
渗透压	X	X				
外观（重建前）		X	X	X	X	X
视觉外观（BDS或重组后	X	X	X	X	X	X
重建时间（仅DP）		X	X	X	X	X
A280	X	X	X	X	X	X
浊度(A330)	X	X	X	X	X	X
非还原SDS-PAGE	X	X	X	X	X	X
还原SDS-PAGE	X	X	X	X	X	X
SE-HPLC	X	X	X	X	X	X
RP-HPLC-NPI	X	X	X	X	X	X
残留水分（仅DP）		X				X
效力和CIEF*	**提供样品用于测试**					

[0669] 注释:研究的液体组的样品在-70℃下冷冻,直到制备冻干组的样品。然后将冷冻液体样品置于条件下,与冻干样品置于条件下相同的时间,以便使研究的液体和冻干组的t＝0相同。

[0670] 具体的冻干循环参数在下表中概述。冻干完成后,将小瓶在50mT的真空下加塞。

[0671] 表17

[0672]

步骤编号	步骤	温度或温度变化速率	时间（分钟）	压力(mTorr)
1	加载/平衡	5°C	60	
2	从5°C至0°C	0.5°C/分钟	10	

[0673]

3	保持	0℃	60	
4	从0℃至-45℃	1℃/分钟	45	
5	保持	-45℃	840	
6	温度下降	-45℃	60	50
7	从-45℃至-15℃	0.3℃/分钟	100	50
8	保持	-15℃	5040	50
9	从-15℃至35 ℃	0.2℃/分钟	250	50
10	保持	35℃	360	50
11	从35℃至5℃	0.5℃/分钟	60	50
12	保持	5℃保持	60	50

[0674] 液体制剂2-8℃和-70℃稳定性研究设计

[0675] 制剂和安慰剂小瓶竖直放置在设定为-70℃的冷冻器和设定为2-8℃的培养箱中。在各时间点,根据样图由储存条件移出各制剂的一个活性物小瓶和一个安慰剂小瓶,用于分析测试。分析测试后,任何剩余的材料都在2-8℃下储存,以防需要重新测试。将等分试样储存在-70℃并用于cIEF和活性测试。

[0676] 冻干制剂2-8℃、25℃和40℃稳定性研究设计

[0677] 将制剂和安慰剂小瓶竖直放置在设定为2-8℃的培养箱、设定为25℃/60％RH的培养箱和设定为40℃/75％RH的培养箱中。在各时间点,根据样图由储存条件移出各制剂的一个活性物小瓶和一个安慰剂小瓶,用于分析测试。分析测试后,任何剩余的材料都在2-8℃下储存,以防需要重新测试。将等分试样储存在-70℃并用于cIEF和活性测试。

[0678] 本研究中使用的制剂标准与上文第6.2部分中的相同。

[0679] 冻干循环分析:典型的冻干循环包括冷冻、初级干燥和次级干燥步骤。在冷冻和干燥过程中,冰的升华可以通过参考几个单独的指标来跟踪,例如置于安慰剂样品瓶中的热电偶探针的读数,电容压力计和皮拉尼规(pirani gauge)压力读数的差异和后续的一致,和跟踪腔室顶部空间相对湿度变化的“露点”测量值。

[0680] 通过比较平均产品热电偶温度、电容压力计/皮拉尼规读数差异和露点曲线,可以证明各自都与其他的相关性良好。

[0681] BDS制剂的稳定性:在T＝0、2、4、8和12周时间点评估BDS制剂在2-8℃和-70℃储存条件下以及在2-8℃、25℃和40℃储存条件下的稳定性。在各个时间点通过浓度(A280)、浊度(A330)、SE-HPLC、SDS-PAGE(R和NR)和RP-HPLCNPI分析液体和重建的冻干样品。对于冻干药物产品(DP),仅在t＝0测量冻干前和重建后的渗透压;在各个时间点测量块状物(cake)外观和重建时间;卡尔费休(Karl Fischer)(残留水分)仅在T＝0和T＝12周测量。

[0682] 视觉外观和重建时间:所有三种制剂的块状物制剂是可比的。所有三种制剂的活性物和安慰剂都形成白色、轻微开裂的块状物,表面有光泽。所有保持完整的结构。活性物和安慰剂之间没有差异。活性物和安慰剂之间没有差异。对于在不同条件下储存2、4、8和12周的所有制剂,块状物的视觉外观类似于T＝0,如下表所示。

[0683] 表18

[0684]

	制剂	蛋白质浓度 mg/ml	块状物外观	重建时间(秒)^			视觉外观
				40°C	25°C	2-8°C	
2周	4	10	白色块状物，微裂，表面有光泽	23	19	21	澄清、无色、无颗粒
	9	10		17	21	25	
	14	10		21	22	22	
	4	安慰剂		22			
	9			21			
	14			22			
4周	4	10	白色块状物，微裂，表面有光泽	29	25	23	澄清、无色、无颗粒
	9	10		17	23	21	
	14	10		20	21	27	
	4	安慰剂		29			
	9			26			
	14			20			
8周	4	10	白色块状物，微裂，表面有光泽	25	28	29	澄清、无色、无颗粒
	9	10		25	23	31	
	14	10		24	22	33	
	4	安慰剂		28			
	9			22			
	14			19			
12周	4	10	白色块状物，微裂，表面有光泽	22	28	24	澄清、无色、无颗粒
	9	10		20	22	27	
	14	10		23	25	23	
	4	安慰剂		28			
	9			20			
	14			28			

[0685] 水分分析:完成冻干后,分配来自各个制剂的一个活性物小瓶和一个安慰剂小瓶用于残留水分测试。如下表和图所3A所示,F4和F14的活性物和安慰剂的残留水分非常接近,范围为0.24 -0.70%。。F9在各时间点比F4和F14具有更高的残留水分。

[0686] 表19

[0687]

		残留水分%				SD			
		t=0	t=12周; 2-8°C	t=12周; 25°C	t=12周; 40°C	T=0	2-8°C	25°C	40°C
活性物	F4	0.24	0.25	0.42	0.54	0.03	0.01	0.02	0.03
	F9	0.76	0.55	0.61	0.75	0.02	0.00	0.02	0.02
	F14	0.24	0.24	0.29	0.55	0.01	0.02	0.01	0.01
安慰剂	F4	0.29	0.28	0.56	0.70	0.01	0.02	0.02	0.01
	F9	0.77	0.73	1.15	1.14	0.01	0.03	0.01	0.02
	F14	0.21	0.22	0.44	0.69	0.01	0.02	0.01	0.01

[0688] 结果表示对1个小瓶3次测定的平均值。

[0689] 样品在不同条件下孵育12周后,对于活性物和安慰剂,再次测试各种制剂的残留水分。在2-8℃下储存12周的所有三种制剂的残留水分与t=0相似。在25℃和40℃下储存12周后,F4和F14的水分相对于t=0有所增加。

[0690] 对于测试的所有时间点,在用4.7mL的WFI重建后,所有重建的制剂和安慰剂都是无色澄清的。没有观察到可见颗粒。在所有时间点在所有条件下储存的BDS样品也是澄清无色的。没有观察到可见颗粒。

[0691] A280和渗透压分析:在填充和冻干前,设双重复检查制剂的蛋白质浓度,发现在10mg/mL目标浓度的±1mg/mL内。用4.7mLWFI重建后,冻干前制剂的蛋白质浓度在±1mg/mLBDS内(见下表20,BDS,t=0)。在填充之前和重建之后,设双重复测试配制的样品和缓冲液的渗透压。冻干前和重建后的渗透压在187和194m0sm/kg之间。

[0692] 不同条件下储存的BDS和DP样品的蛋白质浓度结果显示在下表20和图3B中。在大多数条件下蛋白质浓度没有变化。然而,在2-8℃下储存的BDS样品显示蛋白质浓度意外增加。有两个可能的原因:1)小瓶中存在的冷凝物在倒转后可能不会完全合并。虽然已尽力从瓶子的侧面收集所有冷凝物,但仍有一些冷凝物可能被困在瓶盖中;2)如果瓶子的螺纹有缺陷,一些样品可能会发生蒸发,虽然在之前的研究中没有发现这个问题,之前的研究将4mL药物物质填充到这些瓶子并在2-8℃下储存12周。

[0693] 表20

[0694] (12周同时进行的BDS和DP制剂研究A280和浓度数据)

[0695]

	A280					浓度 (mg/mL)				
	BDS - -70°C下的周数									
制剂	0	2	4	8	12	0	2	4	8	12
4	0.757	0.737	0.735	0.740	0.727	10.4	10.1	10.1	10.2	10.0
9	0.735	0.725	0.749	0.727	0.736	10.1	10.0	10.3	10.0	10.1
14	0.743	0.740	0.746	0.764	0.742	10.2	10.2	10.3	10.5	10.2
	BDS - 2-8°C下的周数									
制剂	0	2	4	8	12	0	2	4	8	12
4	0.757	0.749	0.763	0.801	0.812	10.4	10.3	10.5	11.0	11.2
9	0.735	0.748	0.776	0.817	0.918	10.1	10.3	10.7	11.2	12.6
14	0.743	0.759	0.778	0.823	0.824	10.2	10.4	10.7	11.3	11.3

[0696]

	A280						浓度 (mg/mL)					
	冻干DP - 2-8°C下的周数											
制剂	0	0.1	2	4	8	12	0	0.1	2	4	8	12
4	0.757	0.757	0.745	0.778	0.773	0.747	10.4	10.4	10.2	10.7	10.6	10.3
9	0.735	0.769	0.743	0.777	0.782	0.769	10.1	10.6	10.2	10.7	10.8	10.6
14	0.743	0.800	0.766	0.815	0.751	0.769	10.2	11.0	10.5	11.2	10.3	10.6
	冻干DP - 25°C下的周数											
制剂	0	0.1	2	4	8	12	0	0.1	2	4	8	12
4	0.757	0.757	0.751	0.765	0.761	0.751	10.4	10.4	10.3	10.5	10.5	10.3
9	0.735	0.769	0.751	0.778	0.768	0.774	10.1	10.6	10.3	10.7	10.6	10.6
14	0.743	0.800	0.743	0.784	0.770	0.765	10.2	11.0	10.2	10.8	10.6	10.5
	冻干DP - 40°C下的周数											
制剂	0	0.1	2	4	8	12	0	0.1	2	4	8	12
4	0.757	0.757	0.746	0.766	0.758	0.736	10.4	10.4	10.3	10.5	10.4	10.1
9	0.735	0.769	0.750	0.776	0.763	0.766	10.1	10.6	10.3	10.7	10.5	10.5
14	0.743	0.800	0.772	0.807	0.771	0.755	10.2	11.0	10.6	11.1	10.6	10.4

[0697] 表21

[0698] (12周同时进行的BDS和DP制剂研究渗透压数据)

[0699]

	制剂	读数1	读数2	平均值	安慰剂
T=0, 冻干	4	193	194	194	191
	9	197	195	196	192
	14	193	194	194	186
T=0, BDS	4	189	190	190	188
	9	189	190	190	186
	14	188	186	187	180

[0700] A330分析:BDS和DP重建的活性物和安慰剂小瓶的A330测量值显示在下表22和图3C中。活性物小瓶的A330值略高于安慰剂,表明AGS-22M6E蛋白对制剂混浊有贡献。在所有条件下,活性物和安慰剂样品的浊度都没有显著增加。

[0701] 表22

	BDS - -70°C 下的周数				
制剂	0	2	4	8	12
4	0.083	0.085	0.084	0.101	0.091
9	0.091	0.09	0.085	0.096	0.086
14	0.103	0.094	0.097	0.104	0.103
4 安慰剂	0.009				
9 安慰剂	0.01				
14 安慰剂	0.01				

	BDS - 2-8°C 下的周数				
制剂	0	2	4	8	12
4	0.083	0.089	0.082	0.104	0.111
9	0.091	0.09	0.091	0.103	0.114
14	0.103	0.099	0.095	0.111	0.112
4 安慰剂	0.009	0.003	0.004	0.017	0.008
9 安慰剂	0.01	0.009	0.005	0.018	0.015
14 安慰剂	0.01	0.005	0.002	0.022	0.011

[0702]

	冻干 DP - 2-8°C 下的周数					
制剂	0	0.1	2	4	8	12
4	0.083	0.104	0.109	0.107	0.128	0.124
9	0.091	0.104	0.105	0.104	0.111	0.117
14	0.103	0.114	0.12	0.116	0.13	0.12
4 安慰剂	0.009	0.009				
9 安慰剂	0.01	0.03				
14 安慰剂	0.01	0.02				

	冻干 DP - 25°C 下的周数					
制剂	0	0.1	2	4	8	12
4	0.083	0.104	0.108	0.103	0.107	0.12
9	0.091	0.104	0.111	0.104	0.105	0.116
14	0.103	0.114	0.117	0.105	0.124	0.119
4 安慰剂	0.009	0.009				
9 安慰剂	0.01	0.03				
14 安慰剂	0.01	0.02				

	Lyo DP - 40°C 下的周数					
制剂	0	0.1	2	4	8	12
4	0.083	0.104	0.114	0.101	0.109	0.119
9	0.091	0.104	0.11	0.103	0.107	0.109
14	0.103	0.114	0.109	0.105	0.149	0.118
4 安慰剂	0.009	0.009	0.012	0.008	0.015	0.016
9 安慰剂	0.01	0.03	0.013	0.013	0.02	0.017
14 安慰剂	0.01	0.02	0.007	0.009	0.014	0.014

0 周是在冻干前 (BDS t=0)

0.1 周是在冻干后 (之前标记为 t=0 冻干)

[0703] SDS-PAGE分析:图3D和3E显示了BDST＝0(冻干前)和T＝12周样品在2-8℃和-70℃储存条件下的SDS-PAGE分析。图3F、3G、3H显示了在2-8℃、25℃和40℃储存条件下T＝0和T＝12周样品的DP的SDS-PAGE分析。在所有条件下储存12周后,所有制剂均未见明显变化。

[0704] RP-HPLC分析:本研究中的所有BDS和DP样品也通过RP-HPLCNPI方法测试。在任何条件下的任何制剂中均未观察到SGD1010峰(此处未显示数据)。对于在各时间点运行的所有对照,制剂标准中SGD1010的掺入(spike)回收率约为100％。在T＝4周、8周和12周时间点,虽然使用了10mM SGD1010储液的新稀释物和新鲜制备的稀释物,但SGD1010峰掺入和掺入制剂标准中的SGD1010没有分裂(数据未显示在这里)。这在整个序列中是一致的(此处未显示数据)。计算的回收率使用掺入峰的合并面积。

[0705] SE-HPLC分析:下表23总结了该研究各个时间点运行的制剂标准的SE-HPLC数据。数据显示了同一样品在不同运行中的主峰和后峰百分比的变化水平。

[0706] 表23

[0707]

制剂标准			总整合面积的%			整合面积			
周	注射	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
0周	1	19.6	1.3	95.8	2.9	423	30906	924	32253
	2	19.6	1.3	95.8	2.9	404	30758	934	32096
	3	19.5	1.3	96.0	2.7	410	30915	876	32200
	平均值	19.5	1.3	95.9	2.8	412	30860	911	32183
	% CV	0.0	2.2	0.1	3.5	2.4	0.3	3.4	0.2
2周	1	20.7	1.2	95.7	3.1	422	32516	1047	33986
	2	19.8	1.2	95.7	3.0	403	31099	986	32488
	3	19.7	1.2	95.7	3.1	405	31201	1007	32613
	平均值	19.7	1.2	95.7	3.1	410	31606	1013	33029
	% CV	0.0	0.1	0.0	1.0	2.6	2.5	3.1	2.5
4周	1	19.8	1.2	95.3	3.6	379	30322	1133	31834
	2	19.8	1.2	95.4	3.4	382	30449	1100	31931
	3	19.8	1.2	95.5	3.3	400	30918	1066	32384
	平均值	19.8	1.2	95.4	3.4	387	30563	1100	32050
	% CV	0.0	2.0	0.1	3.9	3.0	1.0	3.0	0.9
8周	1	20.2	1.2	95.5	3.3	411	31427	1074	32911
	2	20.2	1.2	95.6	3.1	407	31417	1033	32857
	3	20.1	1.3	95.7	3.0	417	31657	999	33073
	平均值	20.2	1.2	95.6	3.1	412	31500	1035	32947
	% CV	0.1	0.8	0.1	3.9	1.2	0.4	3.6	0.3
总计1	平均值	19.9	1.2	**95.6**	3.1	405	31132	1015	32552
	stdev	0.3	0.0	0.21	0.2	13.8	585.6	76.3	596.1
	% CV	1.7	2.6	**0.22**	7.7	3.4	1.9	7.5	1.8

			总整合面积的%			整合面积			
样品	周	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
制剂标准平均值	0	19.5	1.3	95.9	2.8	412.1	30859.6	911.3	32183
	2	19.7	1.2	95.7	3.1	409.9	31605.7	1013.4	33029
	4	19.8	1.2	95.4	3.4	386.7	30562.9	1100.0	32050
	8	20.2	1.2	95.6	3.1	411.6	31500.2	1035.2	32947
	12	19.4	1.2	95.1	3.6	384.5	29485.9	1125.2	30996

[0708] 下表24概述了SE-HPLC数据,其总结了2-8℃和-70℃条件下储存12周的BDS样品的HMW峰、主峰和LMW峰的百分比(数据在此未显示)。不同时间点的主峰和后峰百分比的变化与制剂标准中看到的变化非常相似(此处未显示数据)。因此,可以得出这样的结论:未发生重大变化,并且所有3种制剂在2-8℃和-70℃液体形式下12周后都是稳定的。制剂之间未观察到重大差异。

[0709] 表24

[0710]

			总整合面积的%			整合面积			
样品名称	2-8 ^{0}C下的周数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
F4	0	19.6	1.3	95.9	2.9	412	31291	940	32642
	2	19.7	1.3	95.6	3.1	445	32429	1056	33930
	4	19.8	1.3	95.4	3.3	425	32200	1119	33744
	8	20.2	1.3	95.9	2.8	479	35060	1032	36571
	12	19.4	1.3	95.3	3.4	449	33754	1216	35419
F9	0	19.6	1.3	95.9	2.8	413	31522	932	32866
	2	19.7	1.3	95.6	3.1	433	32137	1037	33607
	4	19.8	1.3	95.5	3.2	438	32540	1100	34078
	8	20.1	1.3	95.9	2.8	493	35546	1044	37082
	12	19.4	1.3	95.4	3.3	494	36686	1285	38465
F14	0	19.6	1.3	95.8	2.9	439	32730	981	34150
	2	19.7	1.3	95.6	3.1	444	31954	1021	33418
	4	19.8	1.3	95.5	3.2	461	33355	1120	34936
	8	20.1	1.4	95.9	2.8	503	35252	1013	36768
	12	19.4	1.3	95.5	3.2	473	34069	1125	35667

[0711]

			总整合面积的%			整合面积			
样品名称	70 °C下的周数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
F4	0	19.6	1.3	95.9	2.9	412	31291	940	32642
	2	19.7	1.3	95.5	3.2	434	31610	1069	33112
	4	19.8	1.3	95.4	3.3	427	31179	1070	32677
	8	20.1	1.3	95.9	2.8	439	31922	941	33302
	12	19.4	1.3	95.4	3.3	396	29995	1041	31432
F9	0	19.6	1.3	95.9	2.8	413	31522	932	32866
	2	19.7	1.3	95.6	3.1	429	31119	1019	32567
	4	19.8	1.3	95.4	3.3	426	31384	1079	32889
	8	20.1	1.3	95.9	2.8	442	32178	938	33559
	12	19.4	1.3	95.4	3.3	397	30027	1051	31475
F14	0	19.6	1.3	95.8	2.9	439	32730	981	34150
	2	19.7	1.3	95.6	3.1	431	31071	1000	32502
	4	19.8	1.3	95.4	3.3	437	31571	1097	33105
	8	20.1	1.3	95.9	2.8	454	32541	952	33947
	12	19.4	1.3	95.4	3.3	412	30512	1046	31970

[0712] 下表25概述了SE-HPLC数据,其总结了在2-8℃,25℃/60％ RH和40℃/75％RH条件下储存12周的冻干AGS-22M6E的HMW峰、主峰和LMW峰的百分。图3I显示了在不同条件下储存的AGS-22M6EBDS和DP的SE-HPLC数据的图表。不同时间点的主峰和后峰百分比的变化与制剂标准中看到的变化非常相似,这表明制剂样品没有发生重大变化。还分析了在不同条件下储存的不同DP制剂的SE-HPLC重叠(此处未显示数据)。冻干之前和之后未观察到差异。处于冻干形式的所有3种制剂在2-8°、25°和40℃下在12周后稳定。除了在各种情况下在T＝0和振荡和冻融研究后对相应BDS观察到的可接受的稳定性曲线之外,所有制剂表现相似并在冻干后提供高质量产品。

[0713] 表25

[0714]

			总整合面积的%			整合面积			
样品名称	2-8 °C下的周数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
F4	0	19.6	1.3	95.9	2.9	412	31291	940	32642
	0.1	19.6	1.2	95.8	2.9	418	32092	972	33483
	2	19.7	1.2	95.7	3.1	400	31564	1027	32991
	4	19.8	1.2	95.6	3.2	413	33168	1106	34687
	8	20.1	1.3	95.8	2.9	449	32603	997	34049
	12	19.4	1.3	95.2	3.5	403	30358	1124	31885
F9	0	19.6	1.3	95.9	2.8	413	31522	932	32866
	0.1	19.6	1.2	95.9	2.9	418	32453	972	33842
	2	19.8	1.3	95.5	3.2	432	31657	1068	33157
	4	19.8	1.3	95.4	3.3	441	32915	1145	34502
	8	20.1	1.3	95.8	2.9	459	33035	1000	34494
	12	19.4	1.3	95.2	3.5	411	31112	1149	32672
F 14	0	19.6	1.3	95.8	2.9	439	32730	981	34150
	0.1	19.6	1.3	95.8	2.9	450	33238	1005	34693
	2	19.8	1.3	95.4	3.2	461	32915	1110	34486
	4	19.8	1.3	95.4	3.3	472	34323	1178	35972
	8	20.1	1.3	95.8	2.9	468	33414	999	34881
	12	19.4	1.3	95.3	3.4	424	31239	1108	32771

			总整合面积的%			整合面积			
样品名称	25 °C下的周数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
F4	0	19.6	1.3	95.9	2.9	412	31291	940	32642
	0.1	19.6	1.2	95.8	2.9	418	32092	972	33483
	2	19.8	1.2	95.6	3.2	406	31761	1069	33236
	4	19.8	1.2	95.4	3.3	410	32451	1138	33999
	8	20.2	1.3	95.7	3.0	431	32611	1019	34061
	12	19.4	1.3	95.2	3.5	420	30805	1142	32367
F9	0	19.6	1.3	95.9	2.8	413	31522	932	32866
	0.1	19.6	1.2	95.9	2.9	418	32453	972	33842
	2	19.7	1.3	95.4	3.3	438	31863	1089	33389
	4	19.8	1.3	95.4	3.4	440	32810	1155	34405
	8	20.2	1.3	95.7	3.0	454	32933	1015	34402
	12	19.4	1.3	95.2	3.5	417	31201	1153	32770
F 14	0	19.6	1.3	95.8	2.9	439	32730	981	34150
	0.1	19.6	1.3	95.8	2.9	450	33238	1005	34693
	2	19.7	1.3	95.4	3.2	456	32561	1104	34121
	4	19.8	1.3	95.3	3.3	470	33734	1180	35383
	8	20.1	1.4	95.7	3.0	480	33192	1027	34698
	12	19.4	1.3	95.2	3.4	445	31605	1142	33192

			总整合面积的%			整合面积			
样品名称	40 °C下的周数	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
F4	0	19.6	1.3	95.9	2.9	412	31291	940	32642
	0.1	19.6	1.2	95.8	2.9	418	32092	972	33483
	2	19.8	1.3	95.4	3.4	414	31498	1120	33032
	4	19.8	1.3	95.4	3.3	448	32735	1144	34327
	8	20.2	1.4	95.5	3.1	455	32159	1045	33659
	12	19.4	1.4	95.1	3.5	450	30523	1137	32109
F9	0	19.6	1.3	95.9	2.8	413	31522	932	32866
	0.1	19.6	1.2	95.9	2.9	418	32453	972	33842
	2	19.8	1.3	95.4	3.3	428	32091	1103	33622
	4	19.8	1.2	95.6	3.2	414	32985	1120	34518
	8	20.2	1.3	95.6	3.1	426	32104	1039	33569
	12	19.4	1.3	95.1	3.6	422	30813	1158	32393
	0	19.6	1.3	95.8	2.9	439	32730	981	34150

[0715]

F 14	0.1	19.6	1.3	95.8	2.9	450	33238	1005	34693
	2	19.7	1.3	95.5	3.2	436	32383	1099	33918
	4	19.8	1.3	95.5	3.2	450	33290	1126	34866
	8	20.2	1.5	95.5	3.0	507	32935	1044	34486
	12	19.4	1.5	95.1	3.5	475	30996	1132	32604

[0716] 6.4实施例4—冻干循环开发

[0717] 选择上述部分中描述的制剂F4用于该进一步的冻干循环开发研究。冻干循环参数如下表所示。冻干完成后,将小瓶在50mT的真空下加塞。从冻干机中取出小瓶托盘,小瓶用铝密封件单独卷曲。

[0718] 表26

[0719]

步骤编号	步骤	温度或温度变化速率	时间(分钟)	压力(mTorr)
1	加载/平衡	5°C	60	
2	从5°C至0°C	0.5°C/分钟	10	
3	保持	0°C	60	
4	从0°C至-45°C	1°C/分钟	45	
5	保持	-45°C	120	
6	温度下降	-45°C	60	50
7	从-45°C至-15°C	0.3°C/分钟	100	50
8	保持	-15°C	2710	50
9	从-15°C至35 °C	0.2°C/分钟	250	50
10	保持	35°C	420	50
11	从35°C至5°C	0.5°C/分钟	60	50
12	保持	5°C保持	60	50

[0720] 冻干制剂研究设计

[0721] 对于各填充体积设置,除了5个安慰剂小瓶外,还填充了5个产品小瓶。在T＝0时,针对各填充体积测试了来自每种活性产品和安慰剂的2个小瓶(测试1小瓶的残留水分,并且使用研究摘要中描述的试验重建和测试1小瓶)。此外,在冷冻干燥过程中,分别检测了来自活性物和安慰剂的2小瓶,用于温度监测。

[0722] 用于该研究的制剂标准是5.0%蔗糖,0.02%吐温20,pH6.0中的12.8mg/mL的AGS-22M6E起始材料。

[0723] 结果

[0724] 冻干循环分析:总保守循环时间为2.6天,这明显短于为5mL填充体积建立的4.7天循环时间(见上文第6.3部分)。然而,本研究的2.6天循环时间不表示针对任一填充体积的优化循环时间。在仔细评估与循环相关的各个读数后,可以为任一填充体积估计优化循环时间。由于露点监测器对两个填充体积产生的水分做出响应,因此在本研究中没有使用它来估计3.0mL或1.5mL填充体积更佳的干燥时间。类似地,皮拉尼真空计(Pirani Gauge)虽然通常是初级干燥时间终点的极好指标,但在这种情况下,其仅提供了指南,因为其过于响应处于保质期的所有小瓶的冰升华。相反,出于本研究的目的,监控产品温度提供了估计各个单独的填充体积的干燥时间的最可靠的工具。在该研究中,热电偶探针置于活性物和安慰剂小瓶中,并观察到两种填充体积的活性物和安慰剂产品温度曲线之间的紧密的一致性。

[0725] 通过产品温度提供干燥时间的准确测量的这种保证,两种填充体积的数据(此处未显示数据)的比较表明,1.5mL填充体积在大约1.3天内干燥,这大大快于3.0mL填充体积在大约1.8天干燥。

[0726] 块状物外观:所有块状物都是完美的块状物,非常轻微地收缩,表面有光泽。它们都保持完整的结构。在大多数小瓶中,块状物上没有裂纹。当小瓶倒置时,块状物没有保持粘附在小瓶上,而是完整地在小瓶中翻滚。在一些小瓶中,在粘附于小瓶的弯月面圆边缘周围观察到细裂纹。对于两种填充体积,活性物和安慰剂的块状物之间没有差异。块状物外观也与在第6.3部分的研究中记录的5mL填充体积冻干产品的块状物外观相当。

[0727] A280分析:在填充和冻干前,设双重复检查制剂的蛋白质浓度,发现接近10mg/mL的目标浓度。分别用2.8mL和1.4mL WFI重建后,3.0mL和1.5mL填充制剂的蛋白质浓度也接

近冻干前的蛋白质浓度(见下表)

[0728] 表27

[0729]

样品	稀释因子(df)	A330nm	A280nm	[蛋白质] mg/mL	平均值 (mg/mL)
冻干前	20	0.00026	0.73176	10.06	10.1
		0.00000	0.74046	10.19	
F4 10mg/mL, T=0 , 3mL	20	0.00126	0.82283	11.30	11.3
		0.00000	0.81551	11.22	
F4 10mg/mL, T=0 , 1.5mL	20	0.00429	0.78214	10.70	10.7

[0730] 残留水分、重建时间、A330、渗透压和视觉外观:完成冻干后,分配来自活性物和安慰剂小瓶的每个填充体积的一个小瓶,用于残留水分测试。如下表28所示,活性物的残留水分范围为3.0mL填充的0.18%到1.5mL填充的0.29%。确定安慰剂的残留水分略高,对于两种填充体积为0.34%。对于所有测试的小瓶瓶,重建时间小于1分钟,其中相较于1.5mL填充体积样品(平均20秒),3.0mL填充体积(平均36秒)记录的时间略高。活性物和安慰剂小瓶之间没有观察到重建时间显著的差异。类似地,所有重建样品(活性剂和安慰剂)的视觉外观报告为透明且无色,并且无颗粒。

[0731] 表28

[0732]

条件	冻干填充体积	重建时间^(秒)		浊度		渗透压 (mOsm/kg)[1]		残留水分% *	
		活性物	安慰剂	活性物	安慰剂	活性物	安慰剂	活性物	安慰剂
T=0	3.0	38	35	0.0645	0.0139	194	186	0.18	0.34
	1.5	22	18	0.0555	0.0097	190	189	0.29	0.34
冻干前				0.0610	0.0142	190	181		
				0.0492	0.0089				

[0733] 活性物和安慰剂小瓶的浊度(A330)测量值也显示在上表中。如图所示,对于冻干前和冻干后样品,活性物小瓶的A330值略高于安慰剂,证实了第6.3部分中讨论的早期结果,其中AGS-22M6E被证明有助于制剂浊度。

[0734] 在填充之前和重建之后,设双重复测试配制的样品和缓冲液的渗透压。上表28总结了这些数据,表明在冻干之前或重建之后,渗透压没有明显差异。它们也与第6.3部分中为5.0mL填充配置样品确定的渗透压相当。

[0735] 图4显示了相较于制剂标准,各填充体积的SDS-PAGE分析(还原和未还原)。结果证明改变填充体积对SDS-PAGE曲线没有任何影响。

[0736] 下表29总结了SEC-HPLC数据,包括在各填充体积下冻干的样品的HMW峰、主峰和LMW峰的百分比。无论评估的填充体积如何,冻干样品的行为相似,并且在冻干前后测量的主峰面积没有差异。未观察任一填充体积的变化,并且该曲线与第6.3部分中描述的研究中冻干的5mL填充体积相当。

[0737] 表29

[0738]

	峰百分比 (%)				峰面积 (mAu)			
样品名称	主峰驻留时间	前峰	主峰	后峰	前峰	主峰	后峰	总计
参考标准	19.8	1.4	95.2	3.4	429	29155	1045	30629
F4，活性物，冻干，3.0 mL 填充	19.8	1.3	95.4	3.3	481	34059	1174	35714
F4，活性物，冻干，1.5 mL 填充	19.8	1.4	95.1	3.5	487	32359	1198	34043

[0739] 从上文可以理解,虽然出于说明的目的在本文中描述了特定实施方式,但是在不偏离本文所提供的精神和范围的情况下可以进行各种各样的修改。上述全部参考文献通过引用其全部内容纳入本文。

[0740] 7.序列表

[0741] 本说明书与序列表的计算机可读形式(CRF)副本一起提交。该CRF名为“14369-244-228_SEQ_LISTING.txt”,于2019年10月11日提交,大小为39,693字节,通过引用其全部内容纳入本文。

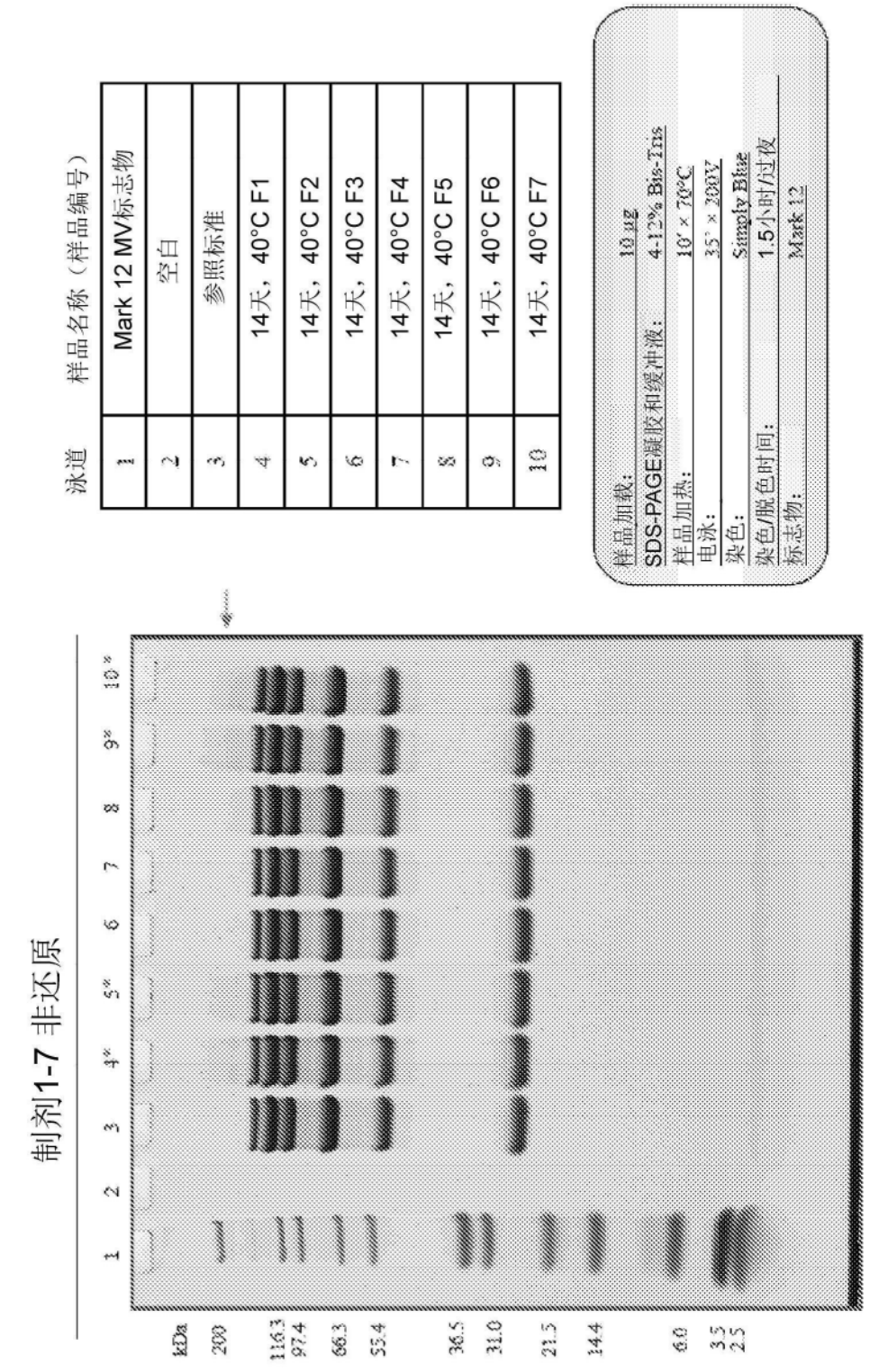

泳道 样品名称（样品编号）
1 Mark 12 MV标志物
2 空白
3 参照标准
4 14天，40°C F1
5 14天，40°C F2
6 14天，40°C F3
7 14天，40°C F4
8 14天，40°C F5
9 14天，40°C F6
10 14天，40°C F7
样品加载: 10 μg
SDS-PAGE凝胶和缓冲液: 4-12% Bis-Tris
样品加热: 10' × 70°C
电泳: 35' × 200V
染色: Simply Blue
染色/脱色时间: 1.5小时/过夜
标志物: Mark 12
制剂1-7 非还原
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31.0
21.5
14.4
6.0
3.5
2.5

图1A

泳道	样品名称（样品编号）
1	Mark 12 MV标志物
2	空白
3	参照标准
4	14天，40°C F1
5	14天，40°C F2
6	14天，40°C F3
7	14天，40°C F4
8	14天，40°C F5
9	14天，40°C F6
10	14天，40°C F7

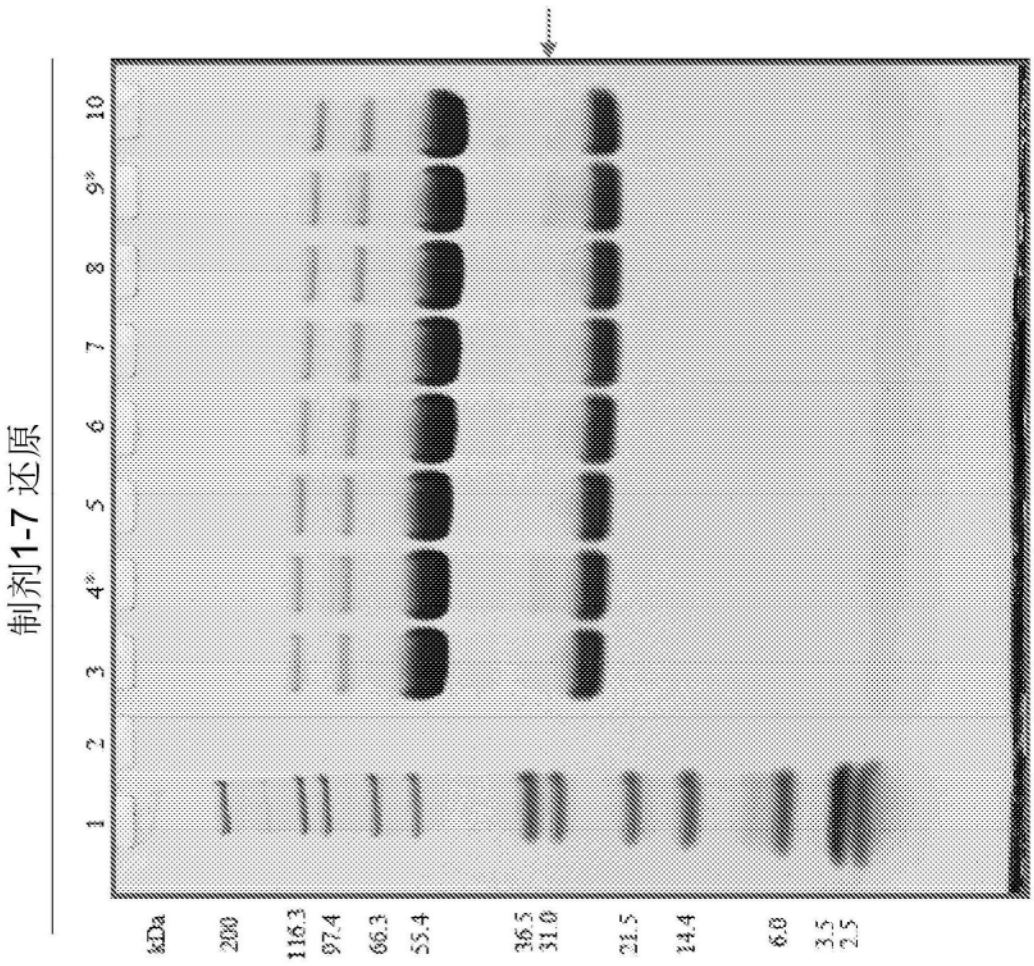


图1B

泳道	样品名称（样品编号）
1	Mark 12 MV标志物
2	参照标准
3	14天，40°C F8
4	14天，40°C F9
5	14天，40°C F10
6	14天，40°C F11
7	14天，40°C F12
8	14天，40°C F13
9	14天，40°C F14
10	空白

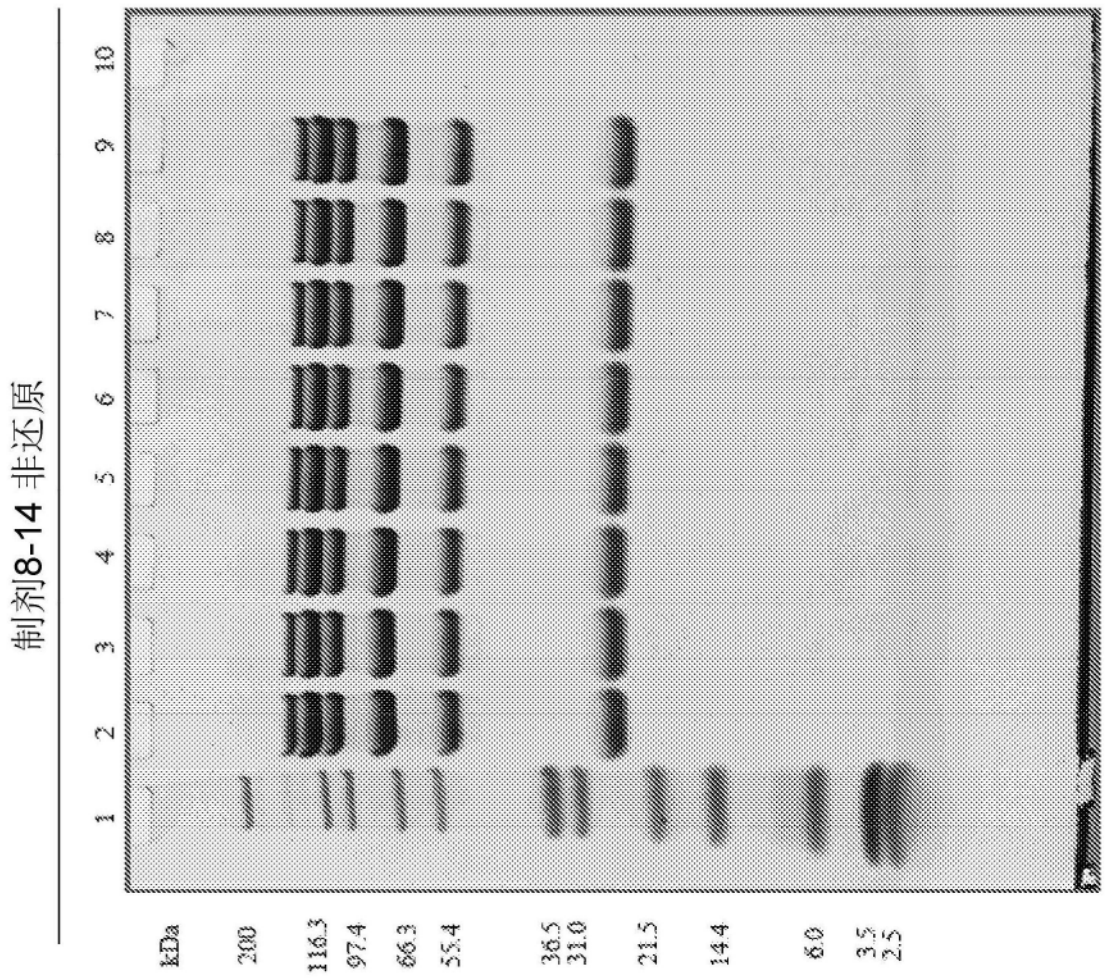


图1C

泳道	样品名称（样品编号）
1	Mark 12 MV标志物
2	参照标准
3	14天，40°C F8
4	14天，40°C F9
5	14天，40°C F10
6	14天，40°C F11
7	14天，40°C F12
8	14天，40°C F13
9	14天，40°C F14
10	空白

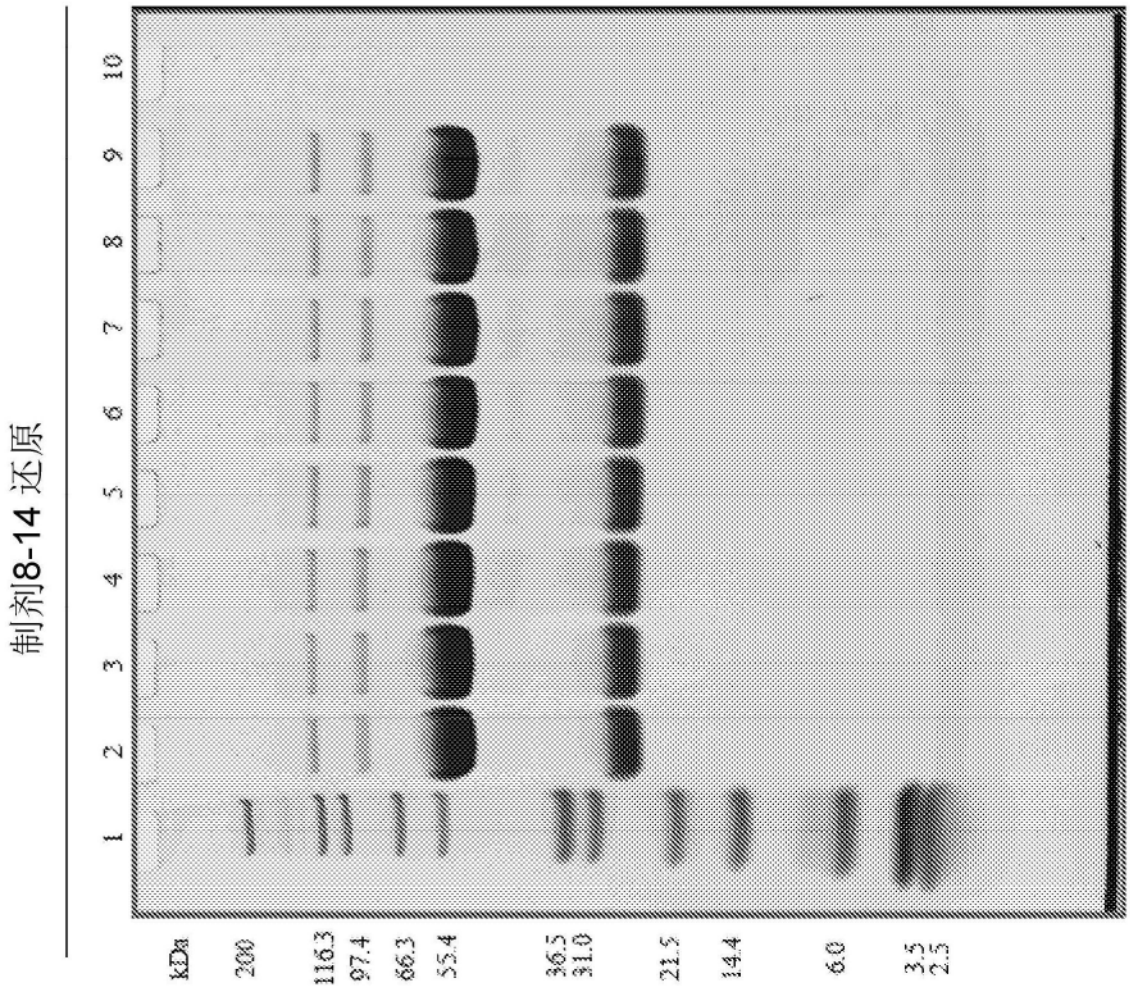


图1D

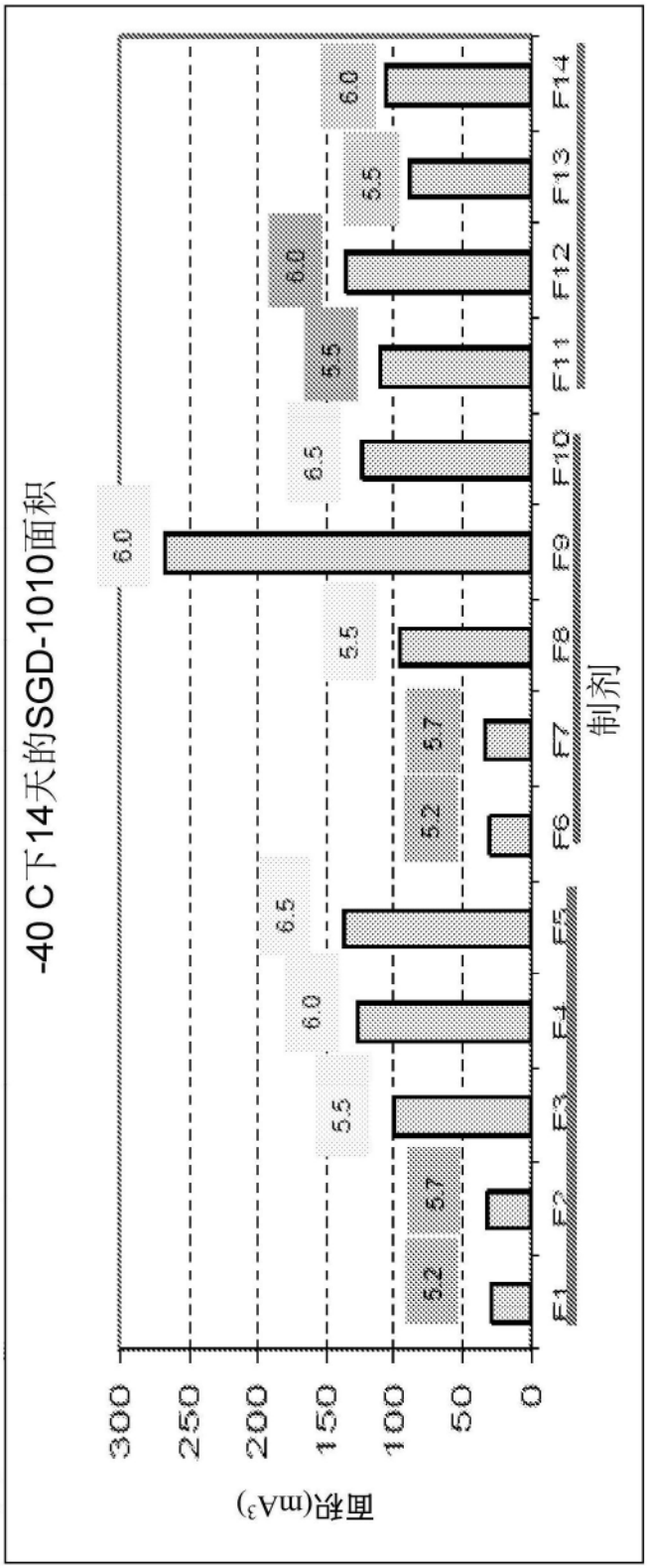

-40 C下14天的SGD-1010面积
面积(mA³)
300
250
200
150
100
50
0
制剂
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
F11
F12
F13
F14
5.2
5.7
5.5
6.0
6.5
5.5
6.0
6.5
6.0
5.5
5.2
5.7
6.5
5.5
6.0
6.0

图1E

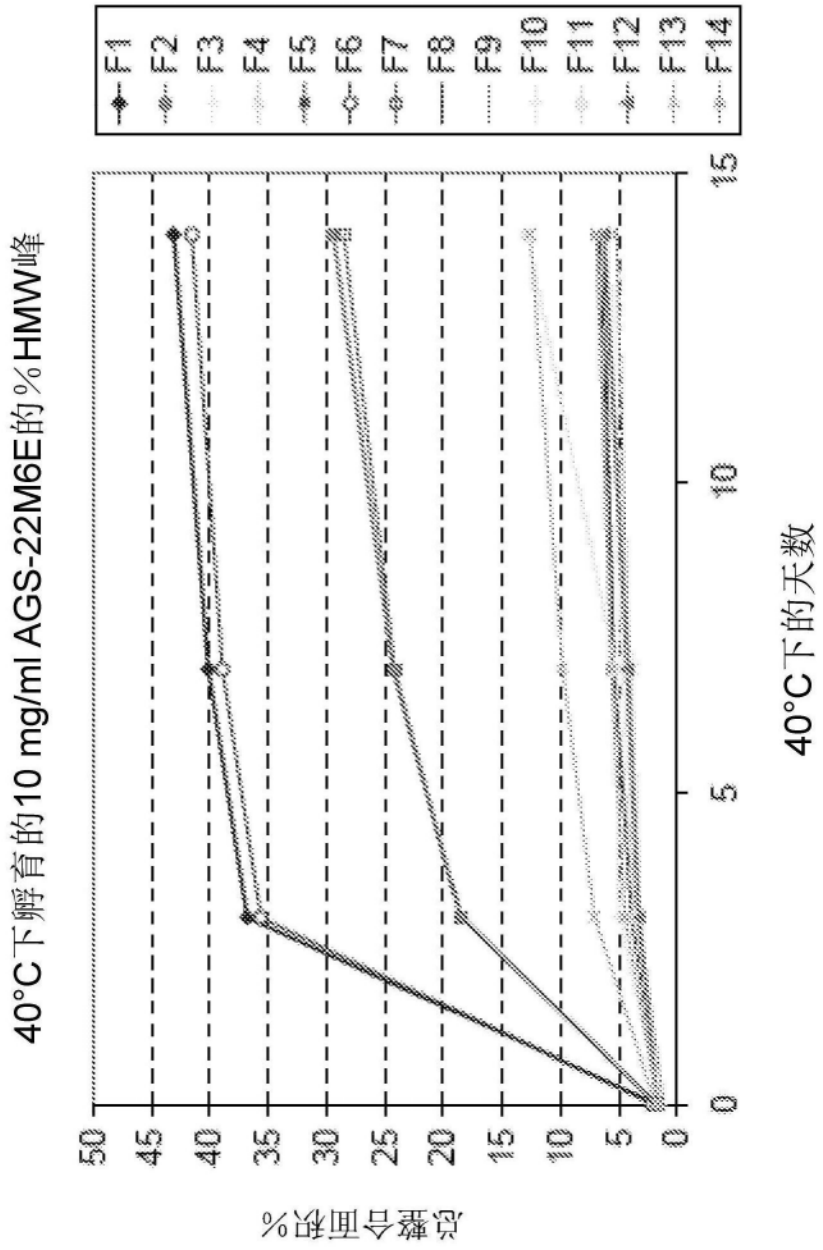

F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
F11
F12
F13
F14
40°C下孵育的10 mg/ml AGS-22M6E的%HMW峰
总整合面积%
0
5
10
15
40°C下的天数
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0

图1F

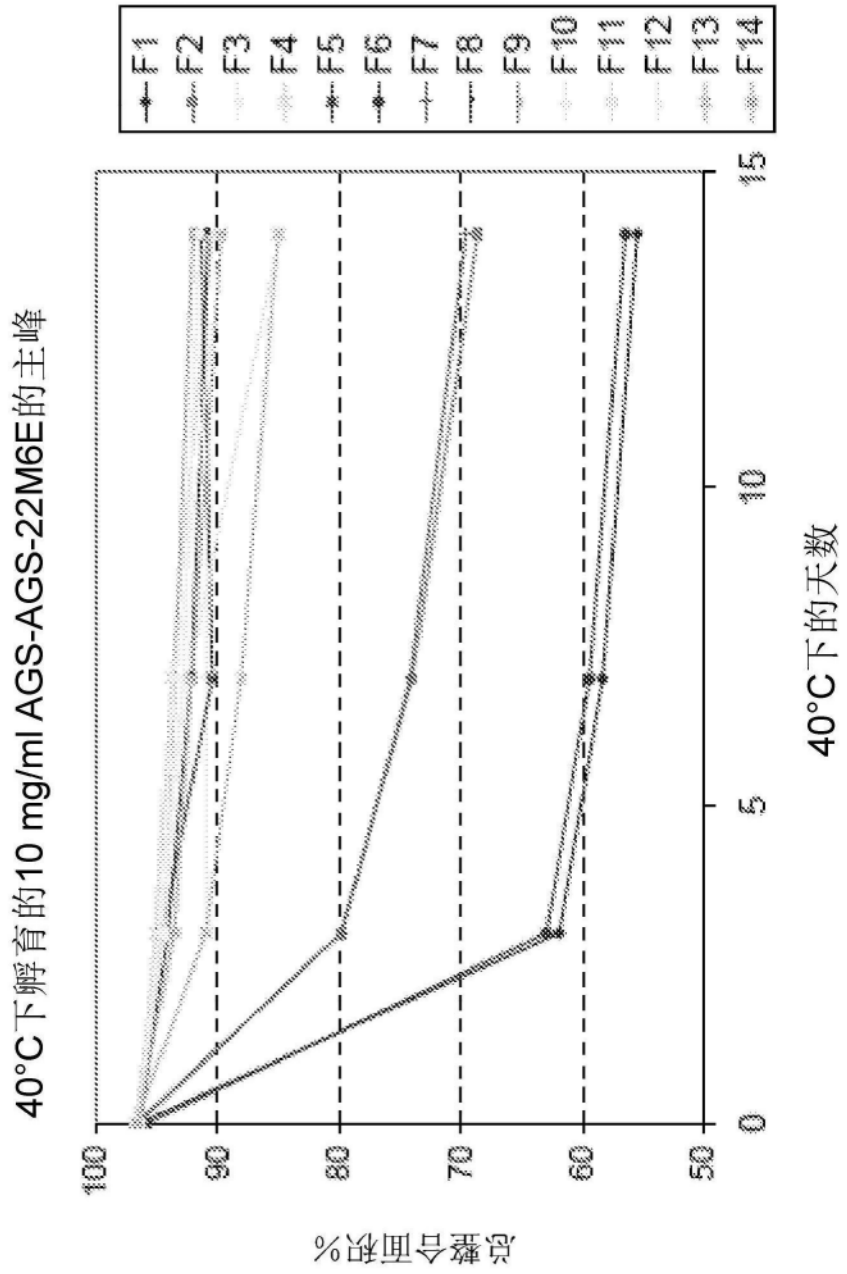

F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
F11
F12
F13
F14
40°C下孵育的10 mg/ml AGS-AGS-22M6E的主峰
总整合面积%
100
90
80
70
60
50
0
5
10
15
40°C下的天数

图1G

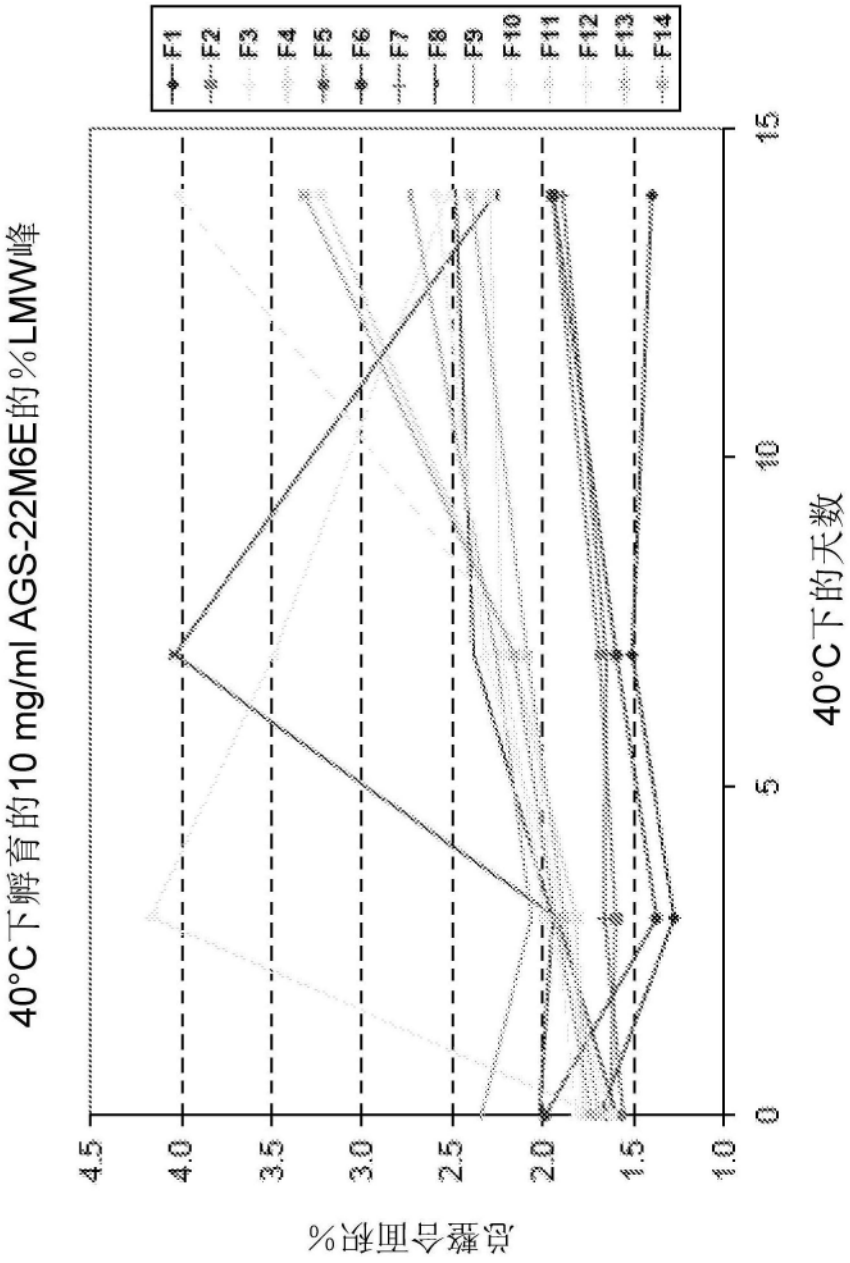

F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
F11
F12
F13
F14
40°C下孵育的10 mg/ml AGS-22M6E的%LMW峰
总整合面积%
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0
5
10
15
40°C下的天数

图1H

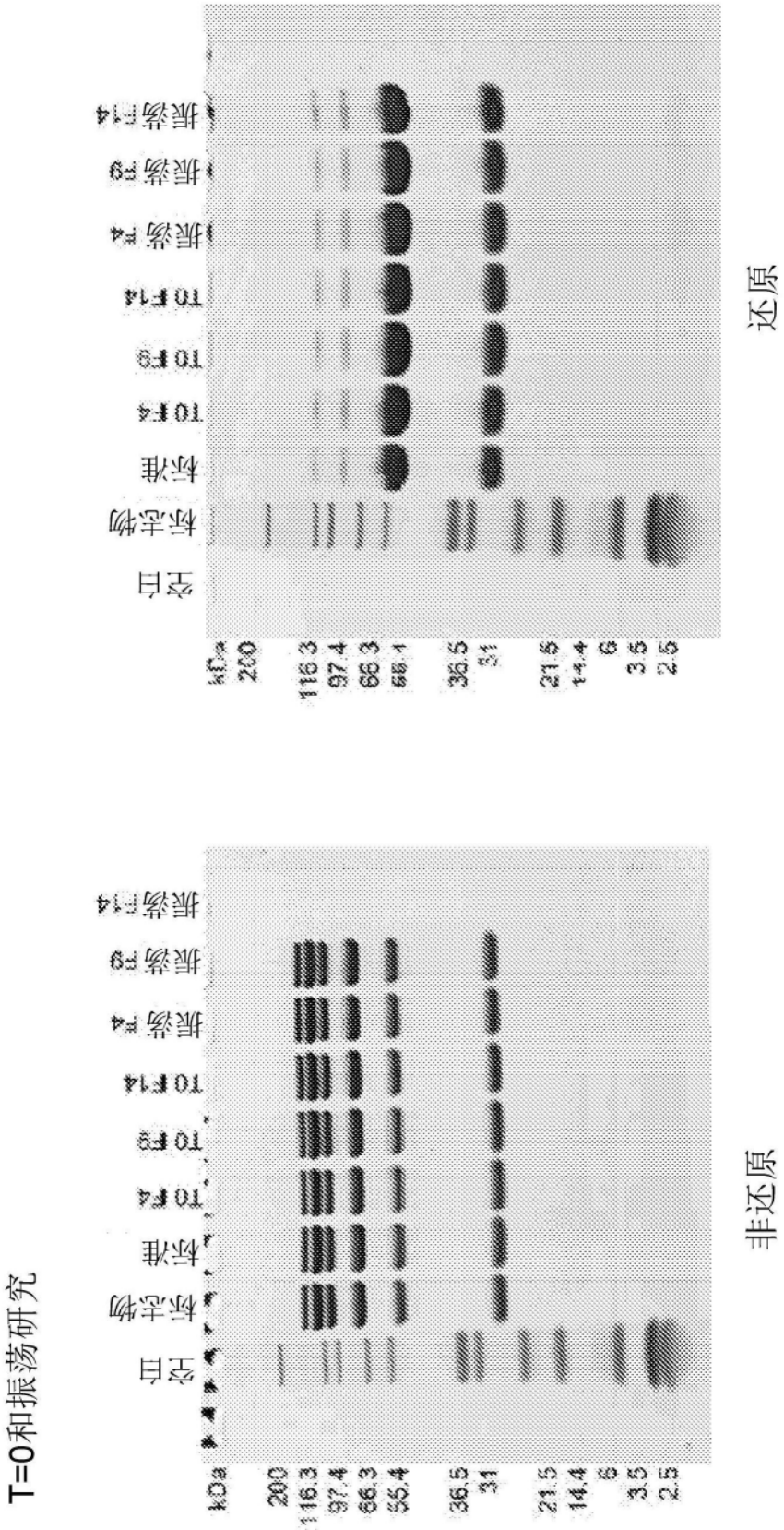

T=0和振荡研究
还原
非还原
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31
21.5
14.4
6
3.5
2.5
空白
标志物
标准
T0 F4
T0 F9
T0 F14
振荡 F4
振荡 F9
振荡F14

图2A

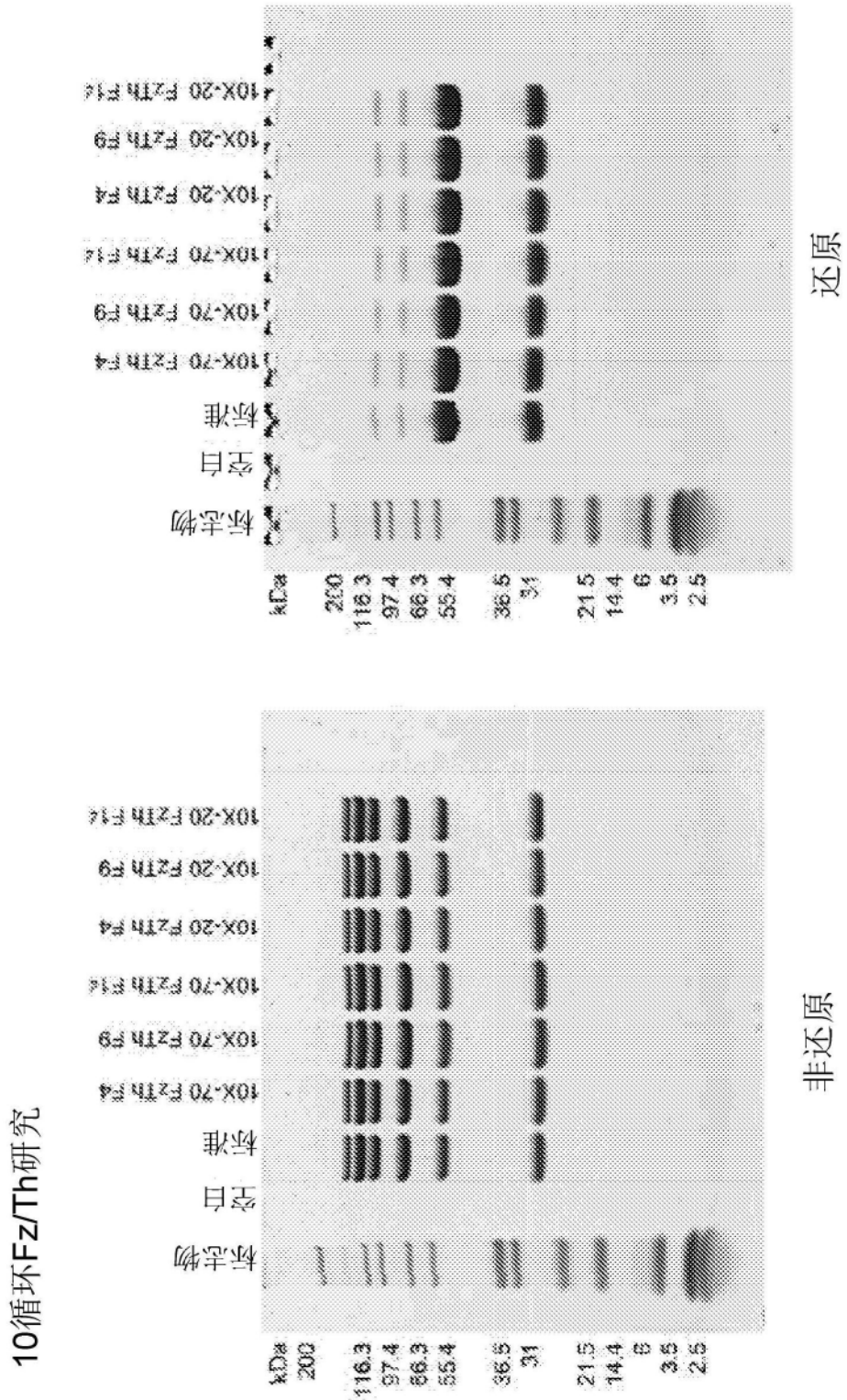

10循环Fz/Th研究
还原
非还原
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31
21.5
14.4
6
3.5
2.5
标志物
空白
标准
10X-70 FzTh F4
10X-70 FzTh F9
10X-70 FzTh F14
10X-20 FzTh F4
10X-20 FzTh F9
10X-20 FzTh F14

图2B

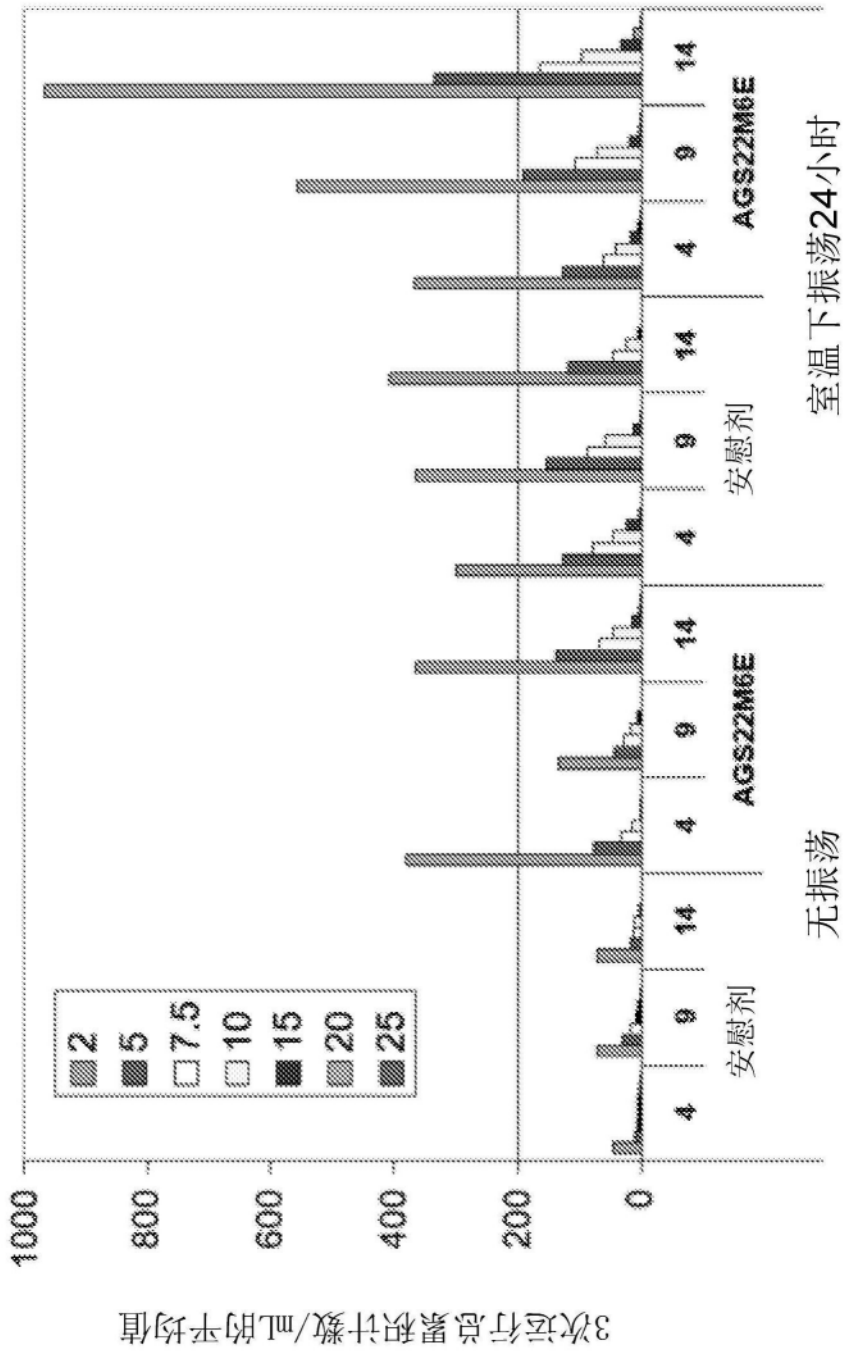

3次运行总累积计数/mL的平均值
1000
800
600
400
200
0
2
5
7.5
10
15
20
25
4
9
14
安慰剂
AGS22M6E
无振荡
室温下振荡24小时

图2C

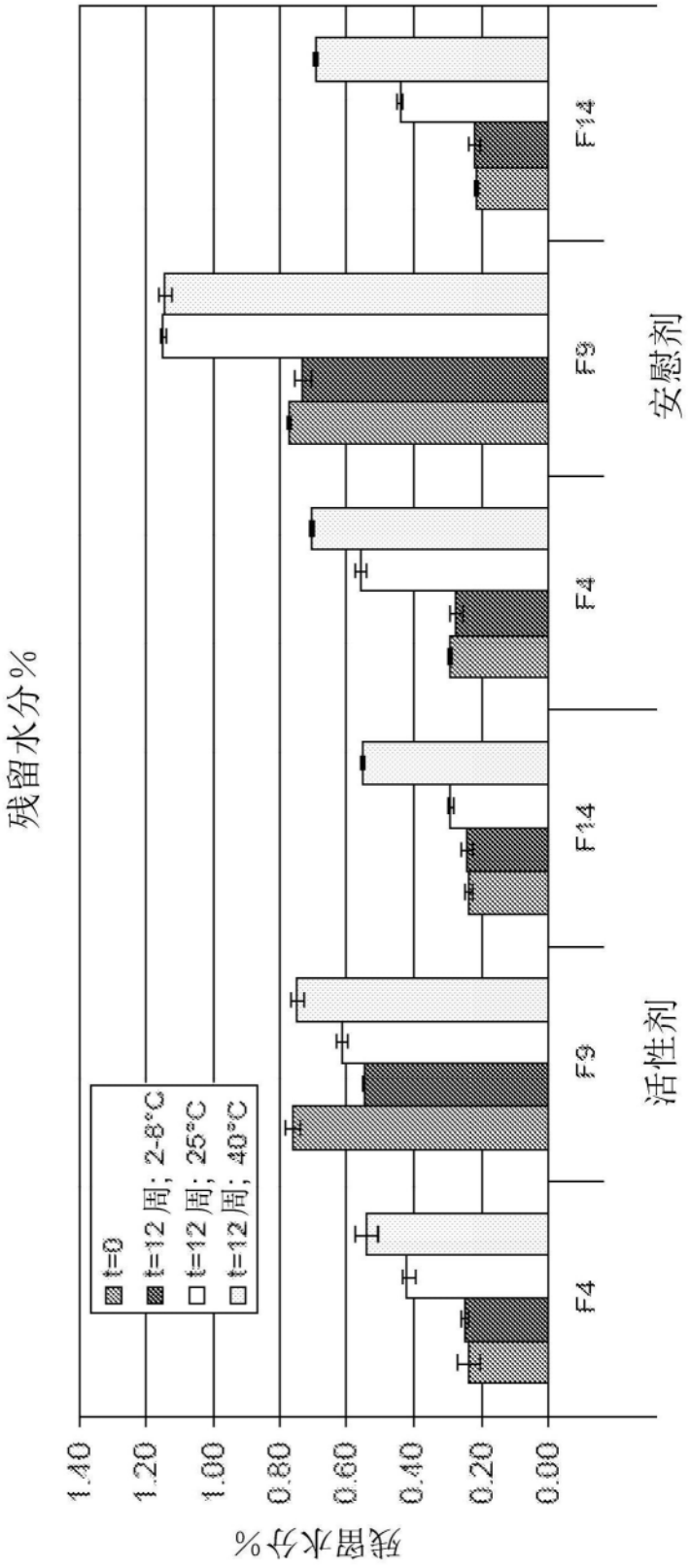

残留水分%
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
残留水分%
t=0
t=12 周; 2-8°C
t=12 周; 25°C
t=12 周; 40°C
F4
F9
F14
F4
F9
F14
活性剂
安慰剂

图3A

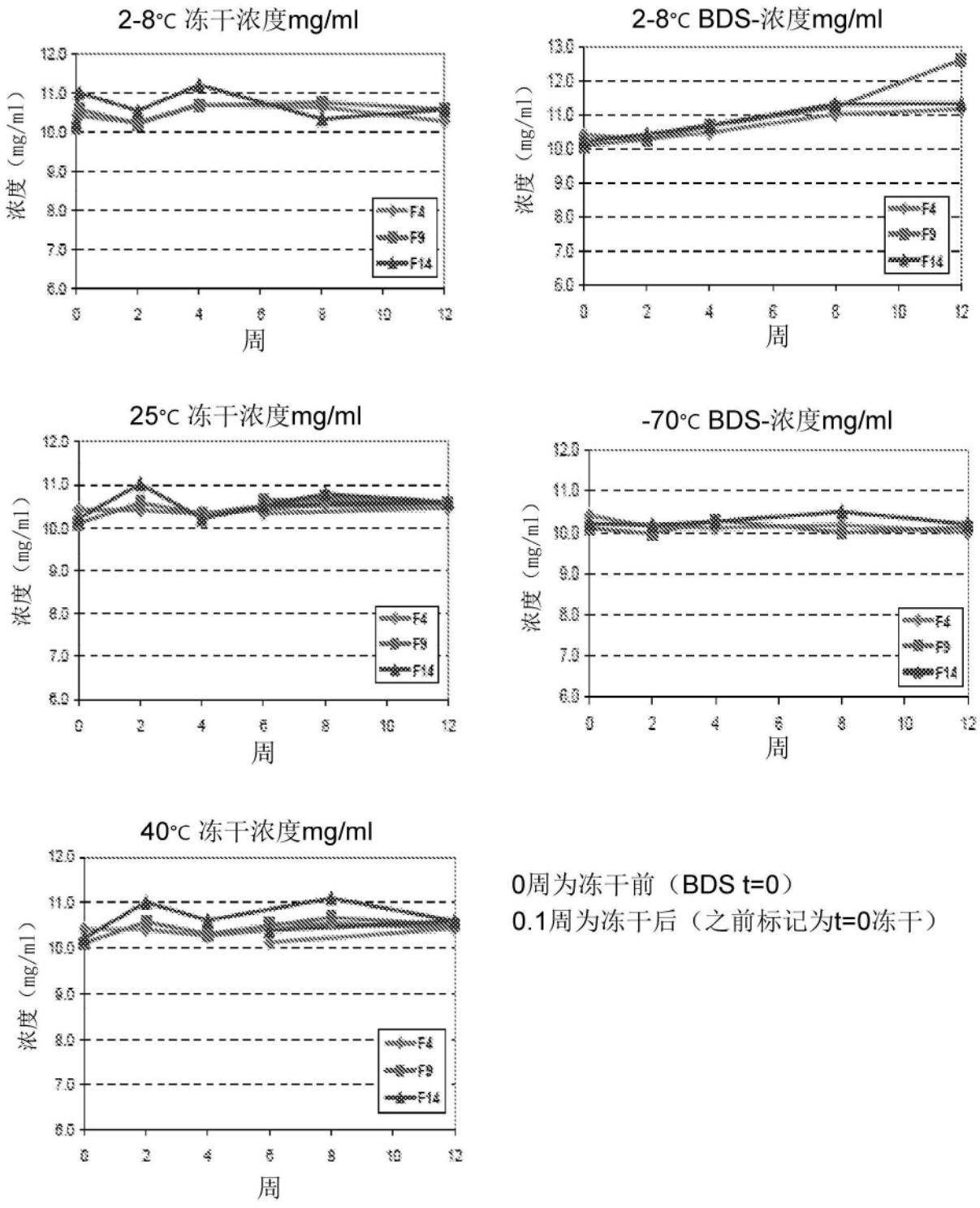
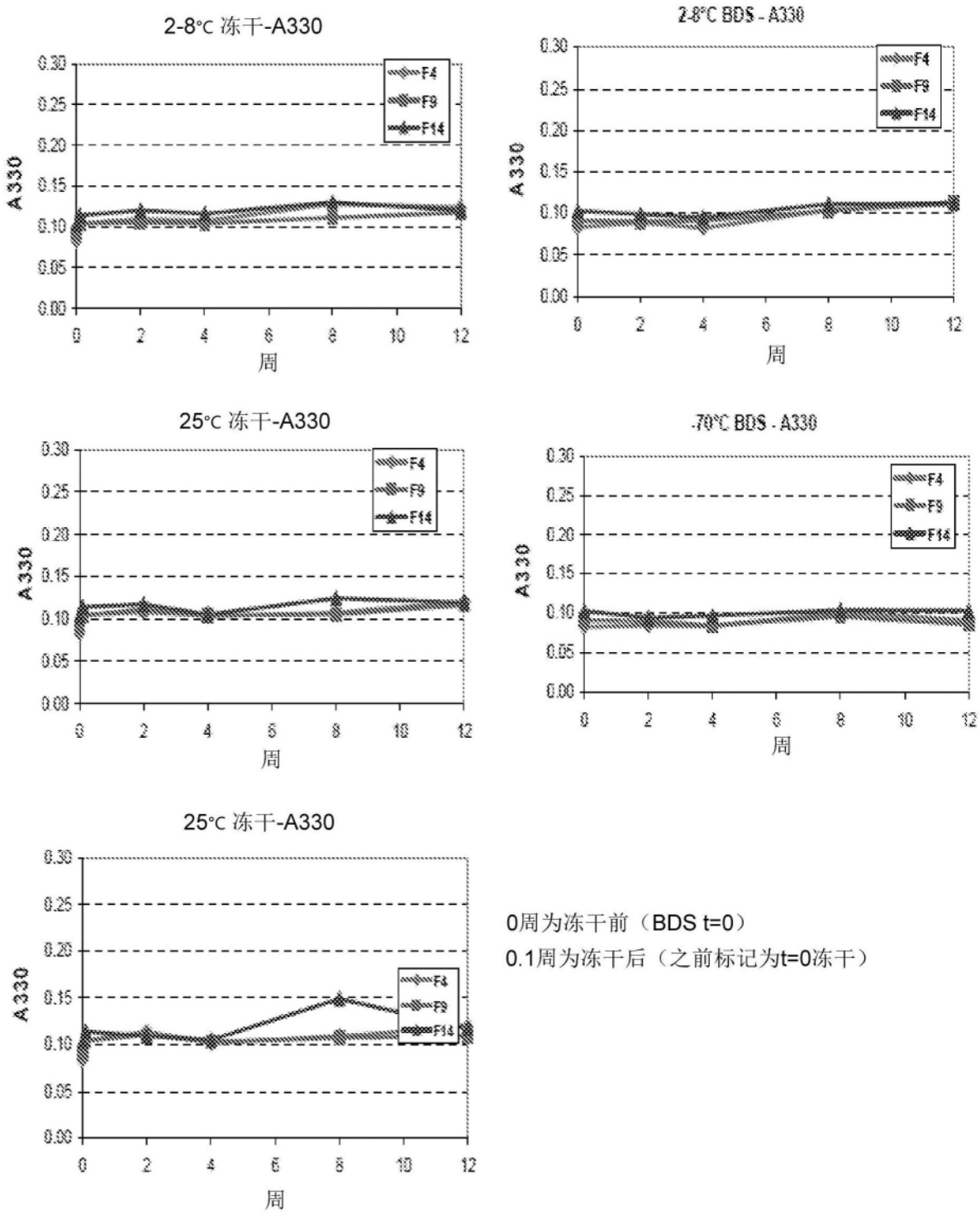

2-8℃ 冻干浓度mg/ml
浓度（mg/ml）
周
F4
F9
F14
2-8℃ BDS-浓度mg/ml
浓度（mg/ml）
周
F4
F9
F14
25℃ 冻干浓度mg/ml
浓度（mg/ml）
周
F4
F9
F14
-70℃ BDS-浓度mg/ml
浓度（mg/ml）
周
F4
F9
F14
40℃ 冻干浓度mg/ml
浓度（mg/ml）
周
F4
F9
F14
0周为冻干前（BDS t=0）
0.1周为冻干后（之前标记为t=0冻干）

图3B



0周为冻干前（BDS t=0）

0.1周为冻干后（之前标记为t=0冻干）

图3C

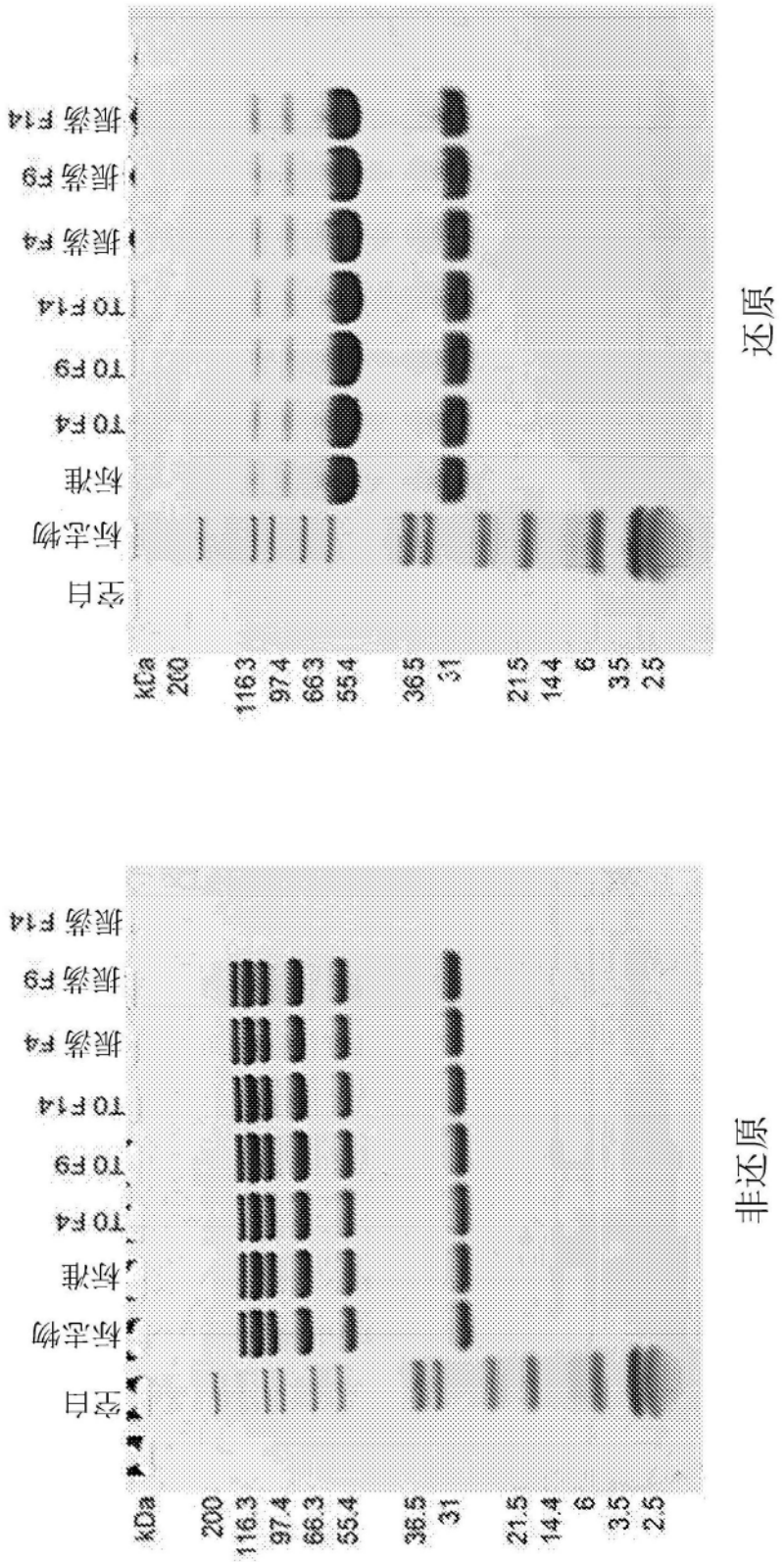

还原
非还原
空白
标志物
标准
T0 F4
T0 F9
T0 F14
振荡 F4
振荡 F9
振荡 F14
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31
21.5
14.4
6
3.5
2.5

图3D

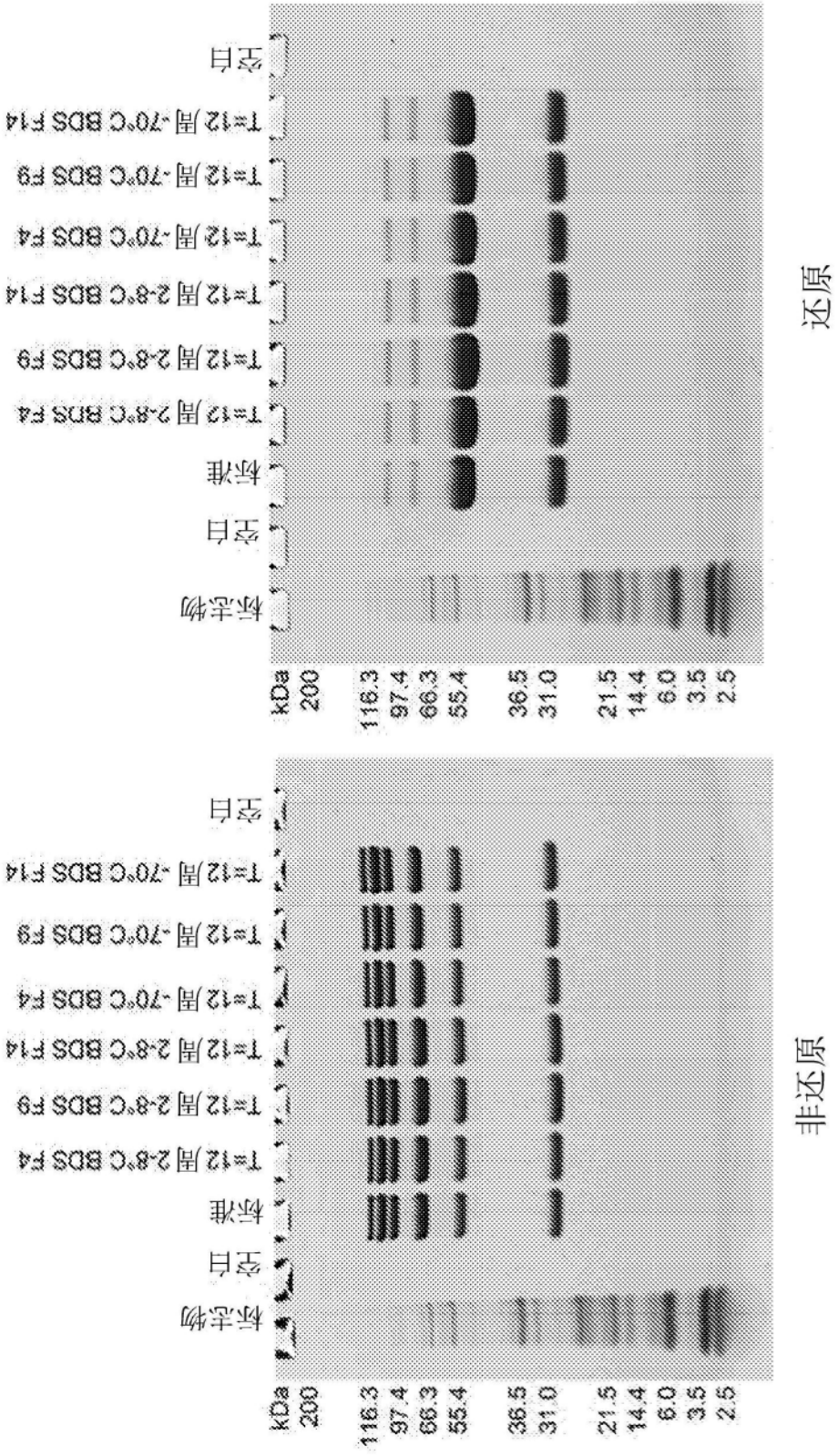

还原
非还原
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31.0
21.5
14.4
6.0
3.5
2.5
标志物
空白
标准
T=12周 2-8°C BDS F4
T=12周 2-8°C BDS F9
T=12周 2-8°C BDS F14
T=12周 -70°C BDS F4
T=12周 -70°C BDS F9
T=12周 -70°C BDS F14
空白

图3E

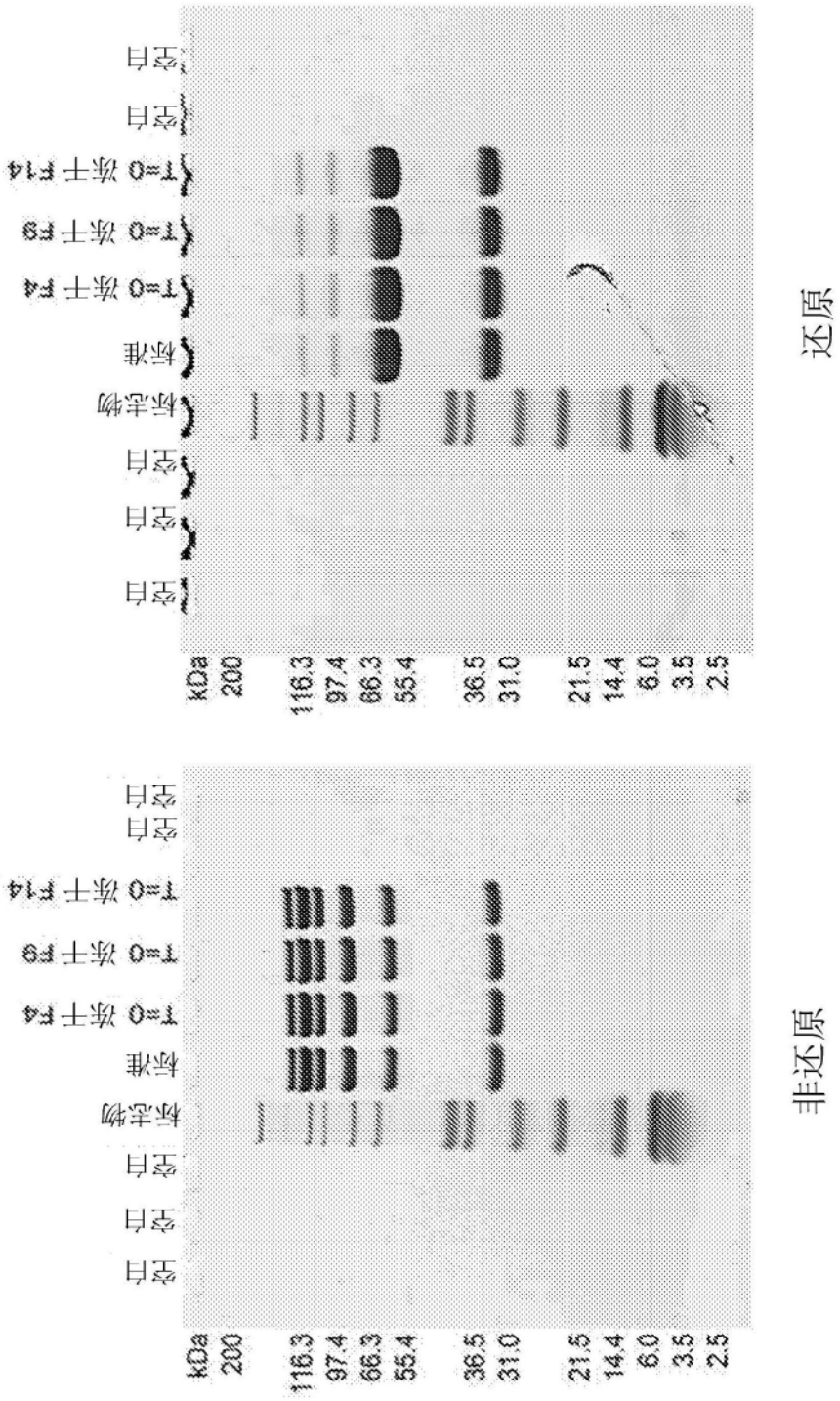

还原
非还原
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31.0
21.5
14.4
6.0
3.5
2.5
空白
标志物
标准
T=0 冻干 F4
T=0 冻干 F9
T=0 冻干 F14

图3F

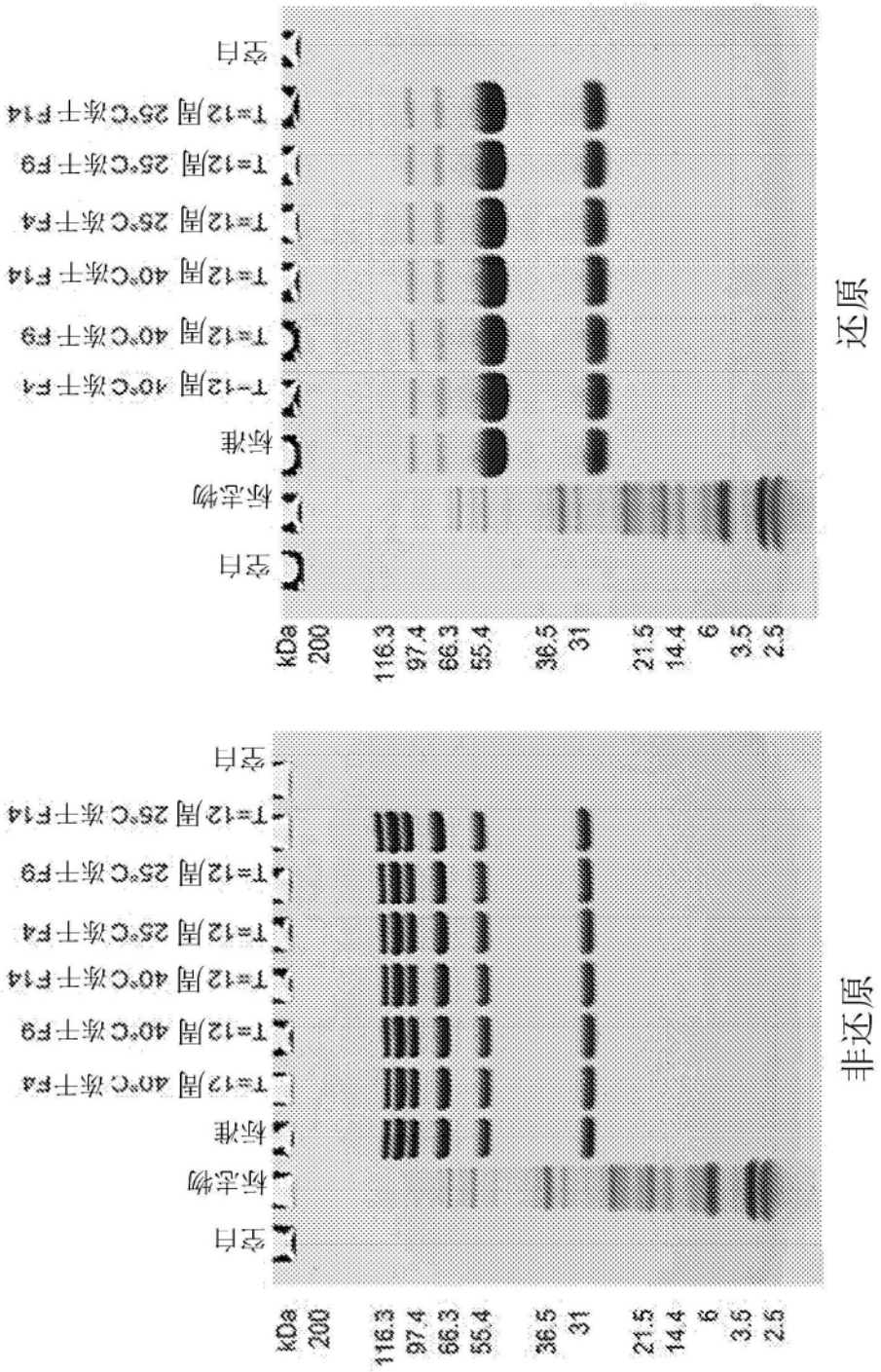

还原
非还原
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31
21.5
14.4
6
3.5
2.5
空白
标志物
标准
T=12周 40°C 冻干 F4
T=12周 40°C 冻干 F9
T=12周 40°C 冻干 F14
T=12周 25°C 冻干 F4
T=12周 25°C 冻干 F9
T=12周 25°C 冻干 F14
空白

图3G

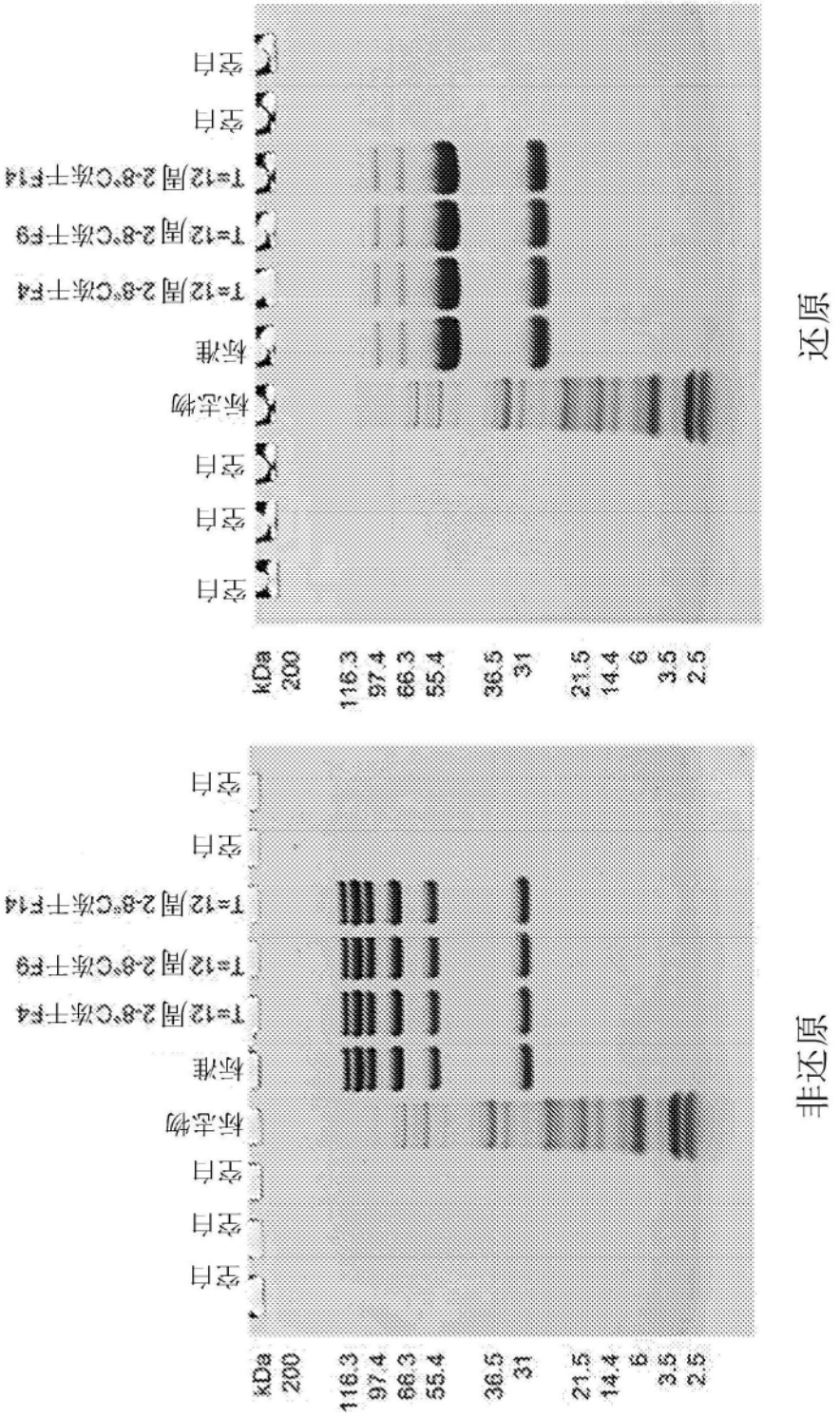

还原
非还原
kDa
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31
21.5
14.4
6
3.5
2.5
空白
空白
空白
标志物
标准
T=12周2-8°C冻干F4
T=12周2-8°C冻干F9
T=12周2-8°C冻干F14
空白
空白
空白

图3H

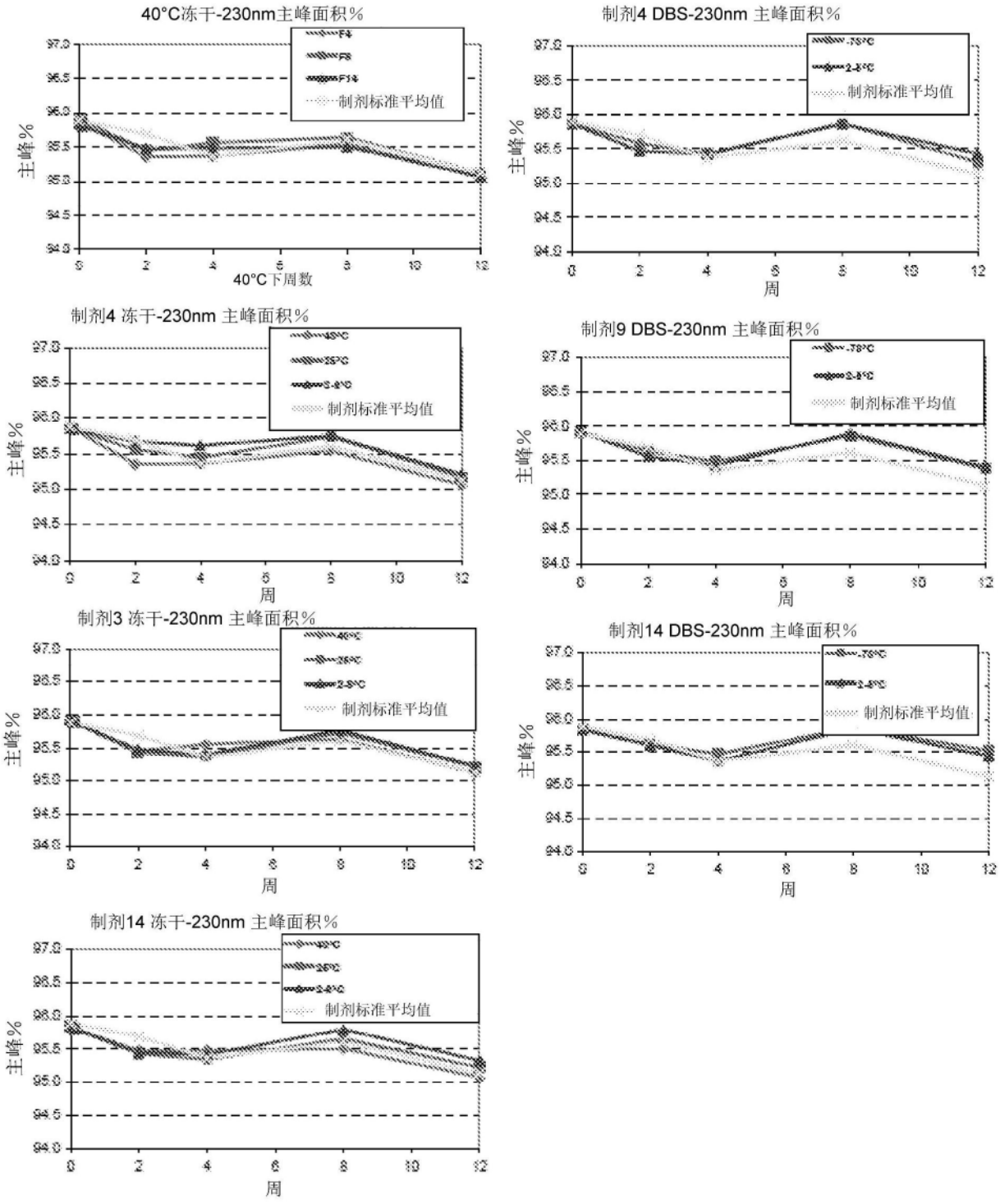

40°C冻干-230nm主峰面积%
制剂标准平均值
主峰%
40°C下周数
制剂4 DBS-230nm 主峰面积%
制剂标准平均值
周
制剂4 冻干-230nm 主峰面积%
制剂标准平均值
主峰%
周
制剂9 DBS-230nm 主峰面积%
制剂标准平均值
主峰%
周
制剂3 冻干-230nm 主峰面积%
制剂标准平均值
主峰%
周
制剂14 DBS-230nm 主峰面积%
制剂标准平均值
主峰%
周
制剂14 冻干-230nm 主峰面积%
制剂标准平均值
主峰%
周

图3I

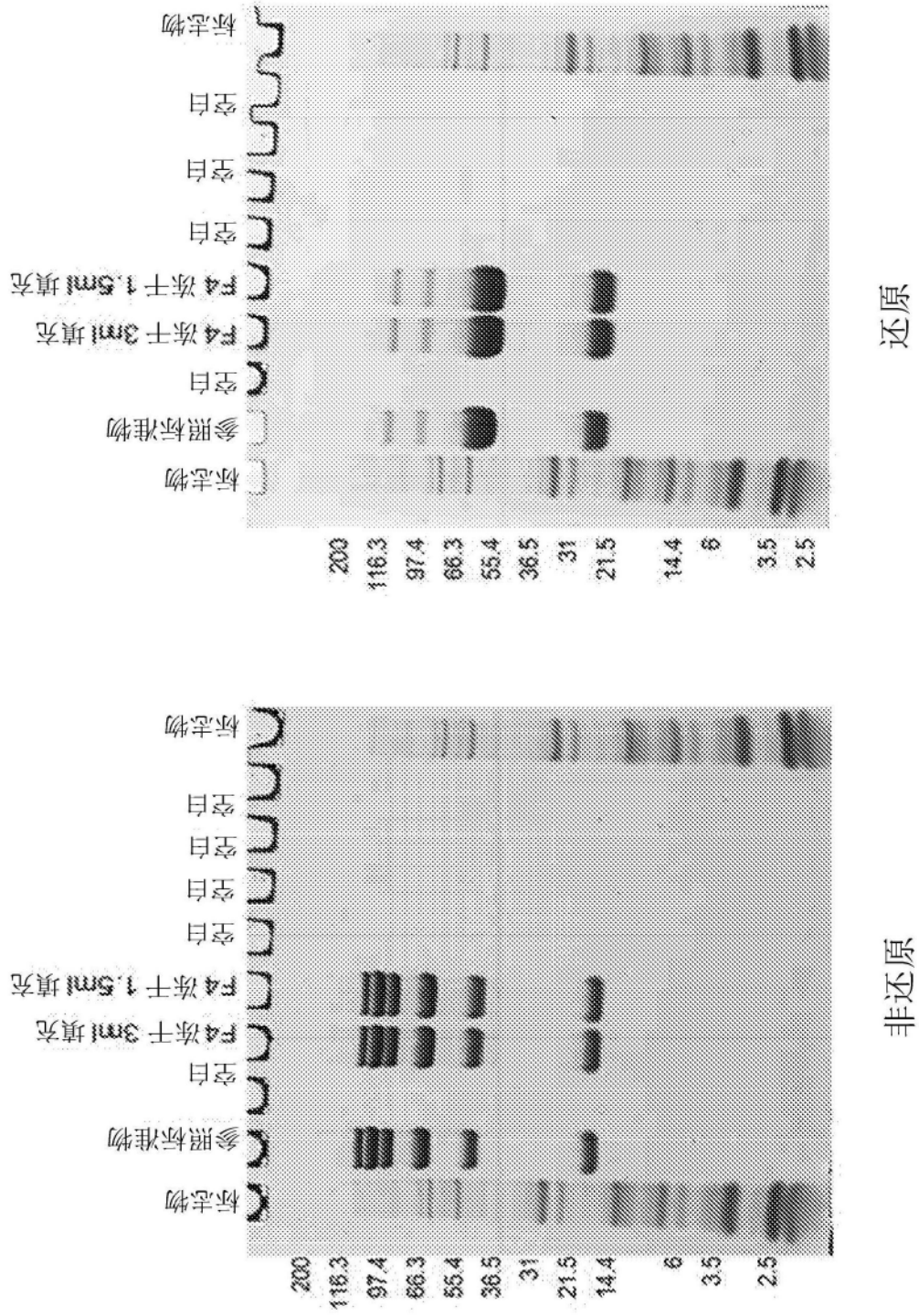

还原
非还原
200
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31
21.5
14.4
6
3.5
2.5
标志物
参照标准物
空白
F4 冻干 3ml 填充
F4 冻干 1.5ml 填充
空白
空白
空白
空白
空白
标志物

图4

191P4D12的cDNA（SEQ ID NO:1）和氨基酸序列（SEQ ID NO:2）。

起始甲硫氨酸下划线标出。开放阅读框延伸自核酸264-1796(包括终止密码子)。

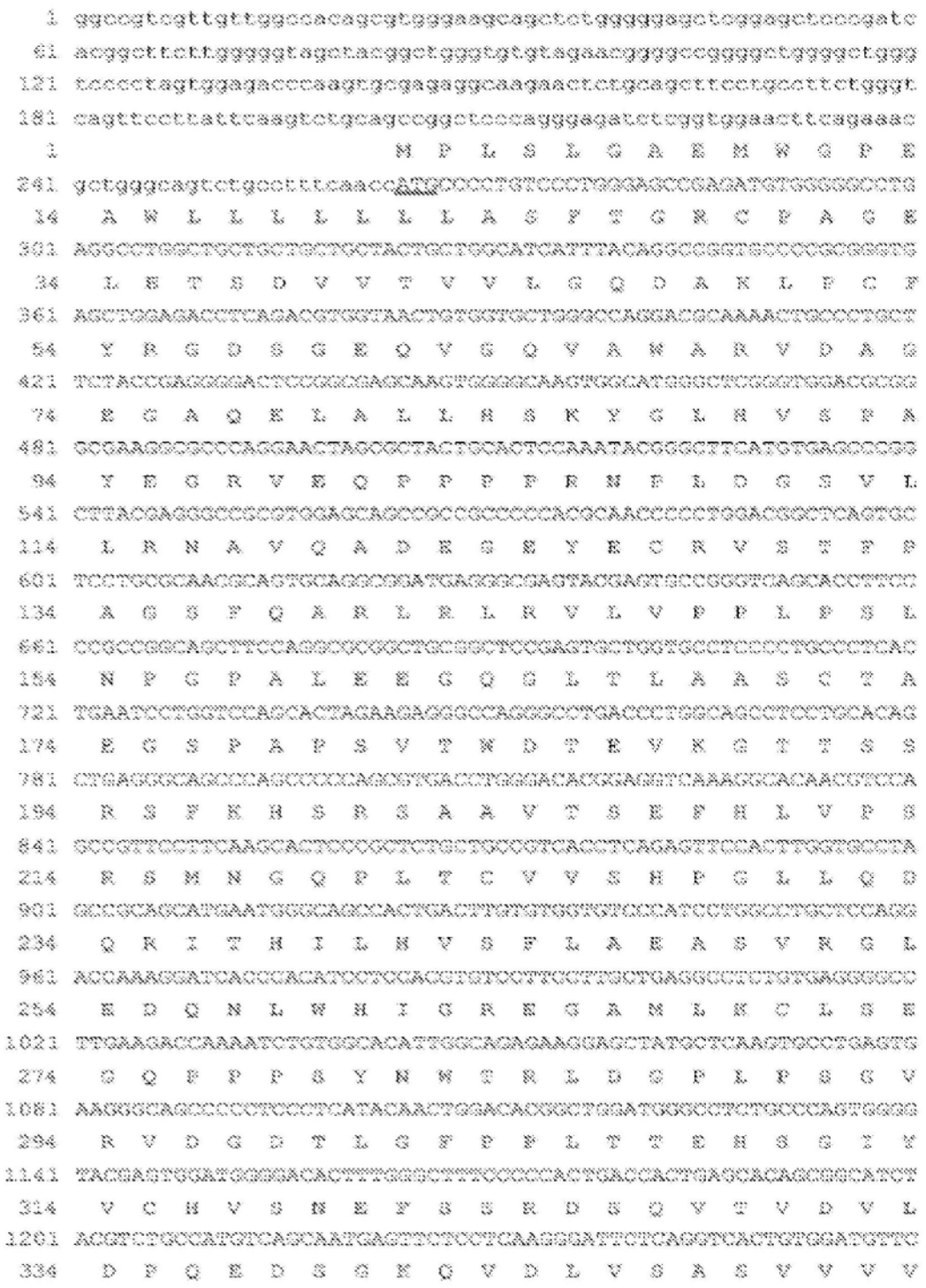


图5A

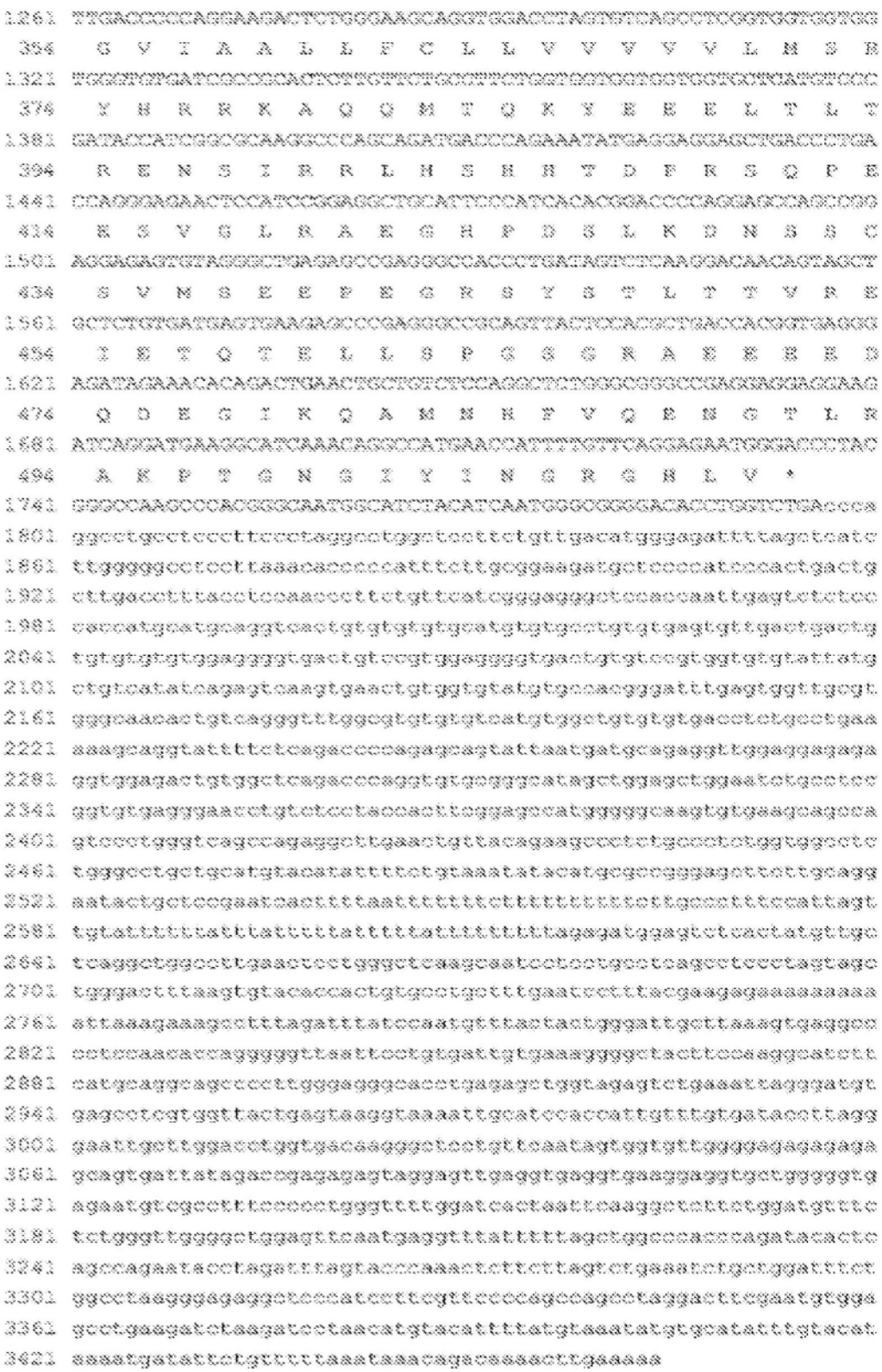
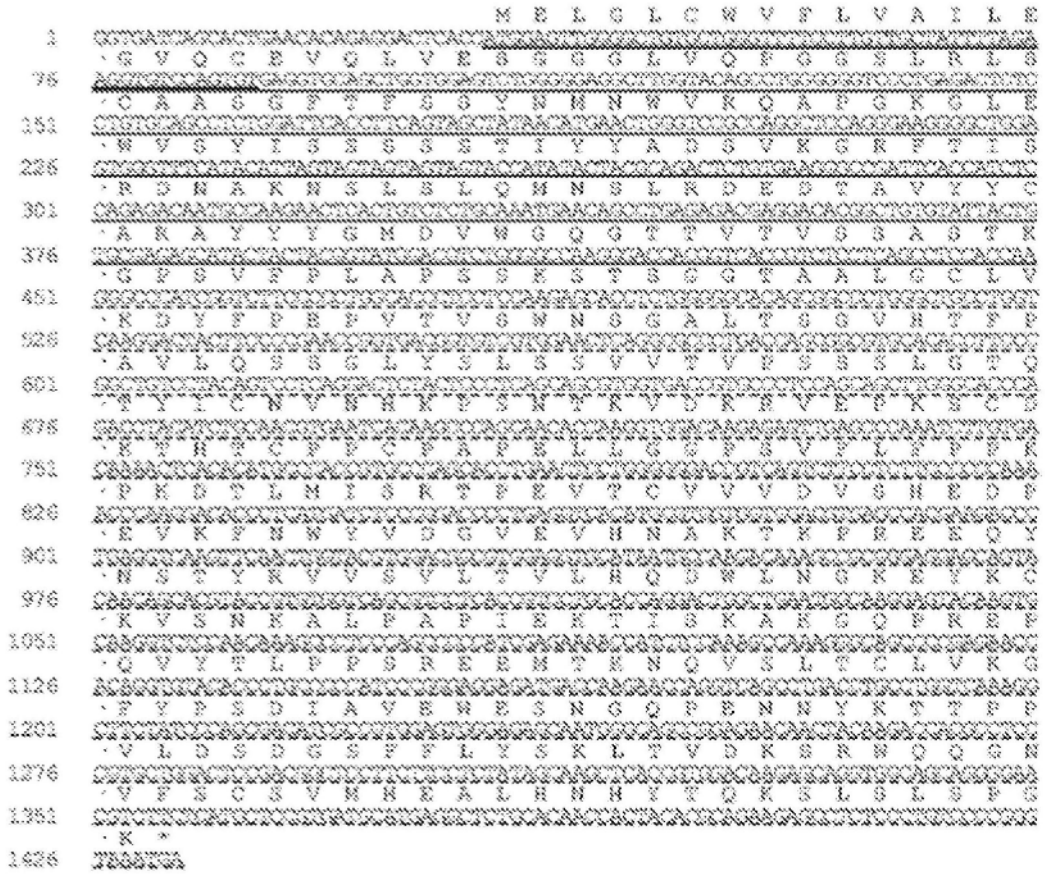


图5A(续)

Ha22-2(2,4)6.1重链的cDNA（SEQ ID NO:3）和氨基酸序列（SEQ ID NO:4）。
双下划线是前导序列，下划线是重链可变区，虚线下划线是人IgG1恒定区。



Ha22-2(2,4)6.1轻链的cDNA（SEQ ID NO:5）和氨基酸序列（SEQ ID NO:6）。
双下划线是前导序列，下划线是轻链可变区，虚线下划线是人κ恒定区。

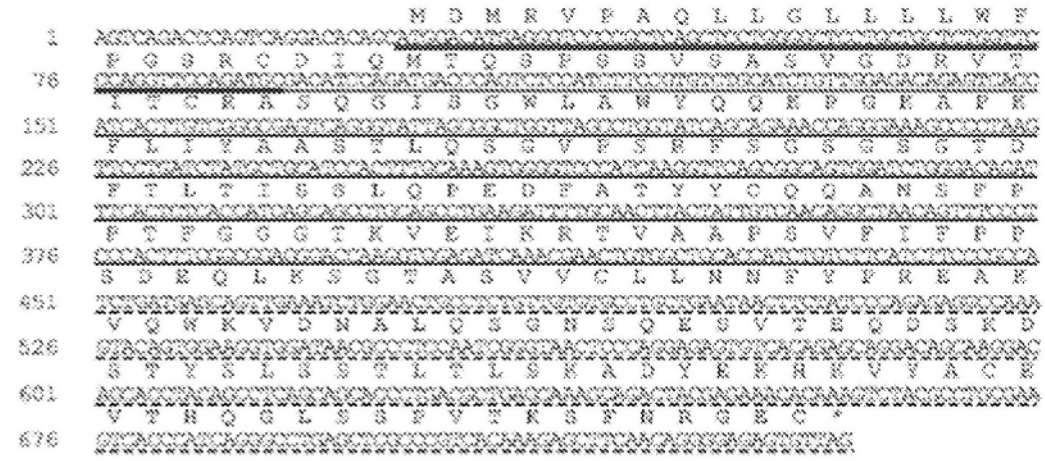


图5B

Ha22-2(2,4)6.1重链的氨基酸序列（SEQ ID NO:7）。

双下划线是前导序列，下划线是重链可变区，虚线下划线是人IgG1恒定区。



Ha22-2(2,4)6.1轻链的氨基酸序列（SEQ ID NO:8）。

双下划线是前导序列，下划线是轻链可变区，虚线下划线是人κ恒定区。

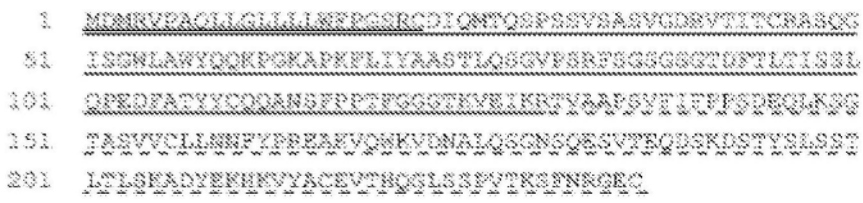


图5C