

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

014513

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2010.12.30**

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(21) Номер заявки: **200800233**

(22) Дата подачи: **2006.08.02**

(54) КОМПОЗИЦИЯ ИММУНОКОНЬЮГАТА

(31) **60/704,902; 60/707,162; 60/746,454;
60/746,456**

(56) **US-A1-20040241174**

(32) **2005.08.03; 2005.08.11; 2006.05.04; 2006.05.04**

(33) **US**

(43) **2008.08.29**

(86) **PCT/US2006/030295**

(87) **WO 2007/019232 2007.02.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИММЬЮНОДЖЕН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Чжанг Вей, Флемминг Майкл С., Амфлет
Годфри, Чих Хунг-Вей, Бартлет Элизабет
(US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает композицию иммуноконъюгата, которая, по существу, свободна от частиц, включающую иммуноконъюгат и один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, полисорбата 20, полисорбата 80, циклодекстрина, декстрозы, глицерина, полиэтиленгликоля, маннитола, хлорида натрия и аминокислоты, причем композиция является водным буферным раствором, имеющим pH 4,5-7,6. Настоящее изобретение обеспечивает также композицию иммуноконъюгата, которая, по существу, свободна от агрегатов, включающую иммуноконъюгат и один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из гистидина, сахарозы, глицина и хлорида натрия, причем композиция является водным буферным раствором, имеющим pH 4,5-7,6. Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает композицию иммуноконъюгата, которая, по существу, свободна от частиц и агрегатов.

014513

B1

B1

014513

Эта заявка является продолженной согласно 35 U.S.C. § 119(e) в отношении заявок № 60/704902, поданной 3 августа 2005 г.; 60/707162, поданной 11 августа 2005 г.; 60/746454, поданной 4 мая 2006 г. и 60/746456, поданной 4 мая 2006 г., раскрытие которых в их целостности включено сюда путем ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам приготовления стабильных иммуноконъюгатов, которые представляют собой фармацевтические соединения, состоящие из антитела и одной или нескольких ковалентно связанных с ним молекул лекарств.

Предшествующий уровень техники

Иммуноконъюгаты разработаны как мощные и специфические агенты для лечения рака и других заболеваний. Иммуноконъюгат состоит из антитела, специфически распознающего антиген клетки-мишени, такой как антиген опухолевой клетки, и одной или нескольких ковалентно связанных молекул лекарств, в частности цитотоксического лекарства, такого как мейтанзиноид, таксан или аналог СС-1065. Другое название, применяемое для таких иммуноконъюгатов, это конъюгаты антитело-лекарство. Иммуноконъюгаты неактивны в кровеносном русле, но связываются с поверхностями клеток-мишеней, вследствие чего они интернализуются клетками. Благодаря механизмам, которые пока не полностью понятны, лекарства затем освобождаются из антитела и могут осуществлять свое фармакологическое действие.

Направленная доставка цитотоксических лекарств к клеткам-мишеням, таким как клетки раковой ткани, потенциально улучшают терапевтические индексы цитотоксических лекарственных препаратов. Обычно цитотоксические лекарства, применяемые как иммуноконъюгаты, являются в 100-1000 раз более сильными, чем традиционные химиотерапевтические лекарства. Примеры таких иммуноконъюгатов раскрыты в международных патентных заявках (PTC) WO 00/02587, 02/060955 и 02/092127; US патентах 5475092, 6340701, 6171586, 6706708 В2 и 6756397 В, а также у Chari et al., Cancer Res., 52, 127-131 (1992).

Фармацевтические композиции, такие как иммуноконъюгаты, комбинируют, главным образом, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами и/или стабилизаторами для получения фармацевтической композиции, которую можно вводить пациентам, а также для хранения или транспорта фармацевтического соединения. Подобно другим фармацевтическим белкам иммуноконъюгаты склонны к деградации, такой как окисление, дезаминирование, а также к формированию частиц или агрегатов и.т.д. (Manning et al., Pharm. Res. 6, 903-918 (1989); Abern and Manning, Stability of Protein Pharmaceuticals: Part A, Chemical and Physical pathways of Protein Degradation, Plenum, New York (1992); and Cleland et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 10, 307-377 (1993)).

Образование частиц в белковых фармацевтических агентах может, в частности, дестабилизировать фармацевтическое соединение, делая композицию, таким образом, менее сильной или даже вредной для клинического применения. Например, частицы инъекционной фармацевтической композиции могут вызывать значительное повреждение вен или пролонгированный венозный застой у пациентов. Кроме того, образование агрегатов является основным путем деградации белкового фармацевтического соединения (Chari et al., Pharm. Res. 20, 1325-1336 (2003)) и может приводить к нежелательным эффектам, таким как иммуногенность.

Конъюгация лекарственных средств, особенно цитотоксических лекарств, которые часто являются небольшими гидрофобными молекулами, с гидрофильными моноклональными антителами, вносит дополнительную нестабильность в иммуноконъюгаты. Способность направлять лекарство в определенное место, относящееся к антителу как компоненту иммуноконъюгата, являются критическими для получения стабильной жидкой или лиофилизированной фармацевтических композиций. Такие композиции иммуноконъюгатов описаны в WO 2004/004639 А2 и US 2004/0241174 А1. Однако эти композиции неадекватно направляют иммуноконъюгаты и образуют агрегаты в фармацевтических композициях иммуноконъюгатов.

Таким образом, сохраняется потребность в фармацевтических композициях иммуноконъюгатов, которые, по существу, свободны от частиц и/или агрегатов и сохраняются, по существу, свободными от частиц и/или агрегатов во время хранения и транспортировки.

Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции иммуноконъюгатов, которые, по существу, свободны от частиц и/или агрегатов и предотвращают образование частиц и/или агрегатов во время хранения и/или транспортировки. Обеспечиваются также способы применения фармацевтических композиций. Эти и другие преимущества изобретения, а также дополнительные особенности изобретения будут очевидны из описаний изобретения, обеспеченных здесь.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано на открытии того, что образование частиц и агрегатов в фармацевтических композициях иммуноконъюгатов может ингибироваться путем применения определенных эксципиентов. Композиции по изобретению обеспечивают большую стабильность и существенно большее время хранения фармацевтических соединений, а также гарантию безопасности пациентов.

Один аспект настоящего изобретения обеспечивает композицию иммуноконъюгата, по существу, свободную от частиц, которая включает иммуноконъюгат и один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, полисорбата 20, полисорбата 80, циклодекстрина, декстрозы, глицерина, полиэтиленгликоля (PEG), маннитола, хлорида натрия и аминокислоты, где композиция представляет

собой буферный водный раствор, имеющий pH от 4,5 до 7,6.

Второй аспект настоящего изобретения обеспечивает композицию иммуноконъюгата, по существу, свободную от агрегатов, которая включает иммуноконъюгат и один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из гистидина, сахарозы, глицина и хлорида натрия, где композиция представляет собой буферный водный раствор, имеющий pH от 4,5 до 7,6.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает композицию иммуноконъюгата, которая, по существу, свободна как от частиц, так и от агрегатов.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает стабильные фармацевтические композиции иммуноконъюгатов, которые, по существу, свободны от частиц и/или агрегатов и остаются, по существу, стабильными от частиц и/или агрегатов в течение продолжительного периода хранения и во время транспортировки. Настоящее изобретение основано на открытии, что образование частиц и/или агрегатов в фармацевтических композициях иммуноконъюгатов может ингибироваться путем применения определенных эксципиентов. Композиции по изобретению обеспечивают большую стабильность и существенно большее время хранения для фармацевтических соединений, а также гарантируют безопасность пациента.

Такие композиции получают путем включения эксципиента, который ингибирует или уменьшает образование как видимых (более 50 мкм) частиц, так и частиц меньшего размера (более 5 мкм). Композиция по изобретению, которая "по существу, свободна от частиц" удовлетворяет тесту US Фармакопеи (USP) <788>, согласно которому количество частиц с размером более 10 мкм должно быть менее 6000 на контейнер, а частиц, размером более 25 мкм - менее 600 на контейнер (USP 28, глава 788 "Твердые частицы в инъекциях", 2004, редакция Фармакопеи Соединенных Штатов Америки, Rockville, MD). Композиция по изобретению, которая "по существу, свободна от агрегатов", будет оставаться свободной от агрегатов при хранении и транспортировке, так что уровень иммуноконъюгатов в виде мономеров остается выше 95% во время всего срока годности композиции.

Типичный срок годности для композиций иммуноконъюгатов настоящего изобретения примерно 1-5 лет, предпочтительно от 1 до 4 лет, более предпочтительно от 2 до 4 лет, при 4°C.

Композиция иммуноконъюгатов изобретения, которая, по существу, свободна от частиц, включает иммуноконъюгат и один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, полисорбата 20, полисорбата 80, циклодекстрина, декстрозы, глицерина, полиэтиленгликоля, маннитола, хлорида натрия и аминокислоты, где композиция представляет собой буферный водный раствор, имеющий pH от 4,5 до 7,6. Композиция может включать один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из: (i) 0,1-12% сахарозы, (ii) 0,005-1,0% полисорбата 20, (iii) 0,5-2% β-циклодекстрина, (iv) 2-8% глицерина, (v) 1-5% PEG6000, (vi) 2-8% маннитола, (vii) 0,005-1,0% полисорбата 80, (viii) 5-20 mM гистидина, (ix) 100-300 mM глицина и (x) 50-300 mM хлорида натрия.

В определенных предпочтительных воплощениях композиция изобретения, которая, по существу, свободна от частиц, предпочтительно включает один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из (i) 5-10% сахарозы; (ii) 0,005-0,2% полисорбата 20; (iii) 0,5-1% β-циклодекстрина, (iv) 2-5% глицерина, (v) 2-3% PEG6000, (vi) 3-5% маннитола, (vii) 0,005-0,2% полисорбата 80, (viii) 10-15 mM гистидина, (ix) 130-250 mM глицина и (x) 100-200 mM хлорида натрия.

В предпочтительных воплощениях буферные водные растворы могут включать один или более из гистидина, сукцината, цитрата, фосфата и ацетата, и значение pH составляет предпочтительно от 5,0 до 7,0. Значение pH композиции наиболее предпочтительно составляет от 5,0 до 6,0.

В определенных воплощениях изобретения иммуноконъюгаты композиции включают гуманизованное антитело, выбранное из группы, состоящей из huMy9-6, huC242, huN901, DS6, трастузумаба, биватузумаба, сибротузумаба и ритуксимаба; и/или иммуноконъюгат включает токсическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из мейтанзиноида, таксана и CCC-1065. Концентрация иммуноконъюгата в композиции изобретения может изменяться примерно от 0,5 до 20,0 мг на 1 мл. Предпочтительно концентрация иммуноконъюгата составляет 0,5-10 мг на 1 мл.

Композиция иммуноконъюгата изобретения, которая, по существу, свободна от агрегатов, включает иммуноконъюгат и один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из гистидина, сахарозы, глицина и хлорида натрия, где композиция представляет собой водный буферный раствор, имеющий pH от 4,5 до 7,6. Предпочтительно композиция иммуноконъюгата включает один или более эксципиентов, выбранных из 5-200 mM гистидина, 100-200 mM глицина и 2-8% сахарозы.

В определенных предпочтительных воплощениях эксципиенты представляют собой 5-100 mM гистидина или 100-150 mM глицина, или композиция включает 2-8% сахарозы и 100-150 mM глицина. В других определенных предпочтительных воплощениях композиция включает 10 mM гистидина, 5% сахарозы и 130 mM глицина.

В предпочтительных воплощениях буферный водный раствор может включать один или более из гистидина, сукцината, цитрата, фосфата и ацетата, и значение pH предпочтительно составляет от 5,0 до 7,0.

В другом аспекте изобретения композиция, которая, по существу, свободна от агрегатов, дополни-

тельно включает полисорбат 20 и/или полисорбат 80, так что композиция, по существу, свободна от агрегатов. Наиболее предпочтительно значение pH композиции составляет от 5,0 до 6,0. Наиболее предпочтительно pH композиции составляет от 5,0 до 6,0.

В другом аспекте изобретения композиция, которая, по существу, свободна от агрегатов, дополнительно включает полисорбат 20 и/или полисорбат 80, так что композиция, по существу, свободна от частиц.

В определенных воплощениях изобретения иммуноконъюгат композиции включает гуманизованное антитело, выбранное из группы, состоящей из huMy9-6, huC242, huN901, DS6, трастузумаба, биватузумаба, сибротузумаба и ритуксимаба; и/или иммуноконъюгат включает цитотоксическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из майтанзиноида, таксана и CCC-1065. Концентрация иммуноконъюгата в композиции изобретения может изменяться примерно от 0,5 до 20,0 мг на 1 мл. Предпочтительно концентрация иммуноконъюгата составляет 0,5-10 мг на 1 мл.

В определенных воплощениях изобретения композиция иммуноконъюгата является, по существу, свободной от агрегатов и частиц. Например, настоящее изобретение обеспечивает композицию иммуноконъюгата, состоящую, по существу, из иммуноконъюгата huN901 в концентрации от 0,5 до 10 мг/мл; 5-15 мМ гистидина и/или 5-15 мМ сукцината; 0,1-10% сахарозы и/или 100-300 мМ глицина; 0,005-0,2% полисорбата 80 и/или 0,005-0,2% полисорбата 20, где композиция представляет собой буферный раствор, имеющий pH в ряду 5-6. Необязательно могут быть включены дополнительные ингредиенты, пока композиция остается, по существу, свободной от агрегатов и частиц.

В другом примере композиция иммуноконъюгата состоит, по существу, из конъюгата huC242-DM4 в концентрации 0,5-10 мг/мл; 5-15 мМ гистидина; 0,1-10% сахарозы и/или 100-300 мМ глицина; 0,005-0,2% полисорбата 80 и/или 0,005-0,2% полисорбата 20, где композиция является водным буферным раствором, имеющим pH от 5 до 6. Необязательно могут быть добавлены дополнительные ингредиенты до тех пор, пока композиция остается, по существу, свободной от агрегатов и частиц.

В основном подходящие эксципиенты, которые могут применяться в конъюгации в соответствии с настоящим изобретением, могут быть выбраны из различных категорий, включая, но не ограничиваясь этим, неорганические соли, органические соли, сахараиды, аминокислоты, полисорбаты, PEG и их комбинации. Предпочтительные эксципиенты выбираются из группы, состоящей из неорганических солей, органических карбоксильных кислот, сахаридов, аминокислот, полисорбатов, PEG, альбуминов, глицерина и их комбинаций.

Примеры подходящих неорганических аминокислот включают, но не ограничиваются этим, хлорид натрия, хлорид кальция, сульфат магния, хлорид магния, сульфат натрия и их комбинации. Хлорид натрия является предпочтительным эксципиентом для применения в настоящем изобретении.

Примеры подходящих органических карбоксильных кислот включают, но не ограничиваются этим, винную кислоту (которая включает рацемат винной кислоты, D-винную кислоту и L-винную кислоту), малеиновую кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, янтарную кислоту, глюкуроновую кислоту и их комбинации. "Кислота", как это применяется здесь, относится к кислоте и к любому гидрату или солям, т.е. к цитратам и сукцинатам. Янтарная кислота является предпочтительным эксципиентом для применения в настоящем изобретении.

Примеры подходящих сахаридов включают, но не ограничиваются этим, сахарозу, трегалозу, декстрозу, маннитол, циклодекстрин и их комбинации. Сахароза и циклодекстрин являются предпочтительными эксципиентами для применения в настоящем изобретении.

Примеры подходящих аминокислот включают, но не ограничиваются этим, гистидин, глицин, лизин, аргинин и их комбинации. Гистидин и глицин являются предпочтительными эксципиентами для применения в настоящем изобретении.

Примеры подходящих альбуминов включают сывороточный альбумин человека.

Примерами подходящих PEG являются PEG с молекулярной массой примерно 200-20000 Да. Предпочтительными PEG являются PEG 4000, PEG 5000, PEG 6000, PEG 8000, PEG 10000.

Примерами подходящих полисорбатов являются полисорбат 20 (TWEEN-20™) и полисорбат 80.

Примерами подходящих циклодекстринов являются α -, β - и γ -циклодекстрин.

Изучая это изобретение, специалист легко определит эксципиенты, которые будут наилучшим образом обеспечивать композицию, которая, по существу, является свободной от частиц и/или агрегатов в данном индивидуальном растворе иммуноконъюгата.

Предпочтительно тоничность композиции иммуноконъюгата является примерно такой, как у крови человека (т.е. является изотоничной крови).

Примерами подходящих тонизирующих агентов являются соли, аминокислоты и сахара. Предпочтительные соли включают моновалентные соли натрия. Предпочтительные аминокислоты включают гистидин, глицин, лизин и аргинин. Наиболее предпочтительным является глицин. Предпочтительные сахара включают моносахариды, дисахариды, линейные олигосахариды и циклические олигосахариды. Предпочтительным дисахаридом является сахароза. Подходящие количества солей, сахаридов и/или аминокислот можно добавлять к композиции изобретения для достижения желаемой тоничности.

Фармацевтическое соединение представляет собой иммуноконъюгат, состоящий из антитела, специфически распознающего антиген клетки-мишени, и одной или нескольких ковалентно связанных молекул цитотоксического лекарственного агента, такого как майтанзиноид, таксан или аналог CC-1065.

Антитело может быть специфическим по отношению к любому типу клеток, но в основном клетками-мишенями, которые должны быть разрушены, являются такие, как клетки опухоли (особенно клетки твердой опухоли), клетки, инфицированные вирусами, клетки, инфицированные микроорганизмами, клетки, инфицированные паразитами, аутоиммунные клетки (клетки, производящие аутоантитела), активированные клетки (те, что вовлечены в отторжение трансплантата или в реакцию трансплантат против хозяина) или любые другие клетки, возникающие вследствие заболевания, или аномальные клетки.

Антитела могут быть любым известным в настоящее время типом антител, или которые станут известными, и могут включать любой иммуноглобулин или фрагмент иммуноглобулина, такой как Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, диатела или триатела, или химерный иммуноглобулин, которые могут связываться с антигеном на поверхности клетки (например, которые включают область, определяющую комплементарность (CDR)). В качестве связывающегося с клеткой агента может применяться любое подходящее антитело. Обычный специалист оценит, что выбор подходящего антитела будет зависеть от клеточной популяции, на которое оно направлено. В этом отношении тип и количество молекул поверхности клеток (т.е. антигенов), которые селективно экспрессируются на определенной популяции клеток (обычно и предпочтительно на популяции клеток, возникающих в результате болезни), будут являться определяющими в выборе подходящего антитела для применения в композиции изобретения. Для широкого ряда типов клеток известен профиль экспрессии белков на клеточной поверхности, включая клетки опухоли, и если он неизвестен, его можно определить с применением обычных методов молекулярной биологии и гистохимии.

Антитело может быть поликлональным или моноклональным, но наиболее предпочтительным является моноклональное антитело. Как он применяется здесь, термин "поликлональные" антитела относится к гетерогенным популяциям молекул антител, обычно включенным в сыворотку иммунизированных животных. "Моноклональные" антитела относятся к популяции молекул антител, которые специфичны в отношении определенного антигена. Моноклональные антитела обычно производятся единственным клоном В-лимфоцитов (В-клеток). Моноклональные антитела могут быть получены с применением различных методов, известных специалисту, включая стандартную гибридную технологию (см., например, Kohler and Milstei, Eur. J. Immunol, 5:511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), and C. A. Janeway et al. (eds), Immunobiology, 5th Ed, Garland Publishing, New York, NY (2001)). Кратко, гибридный способ получения моноклональных антител обычно вовлекает инъекцию антигеном (т.е. "иммуногеном") любого подходящего животного, типично и предпочтительно мыши. Затем животное забивают, и изолированные из его селезенки В-клетки сливают с клетками миеломы человека. Получается гибридная клетка (т.е. "гибридома"), которая бесконечно пролиферирует и постоянно секретирует *in vitro* высокий титр антитела с желаемой специфичностью. Для идентификации гибридных клеток, которые производят антитело с желаемой специфичностью, может быть применен любой подходящий способ, известный специалисту. Такие способы, к примеру, включают, но не ограничиваются этим, иммуноферментный анализ на иммуносорбенте (ELISA), Вестерн-блот анализ и радиоиммуноанализ. Популяция гибридом подвергается скринингу для выделения индивидуальных клонов, каждый из которых секретирует единственный вид антител по отношению к антигену. Поскольку каждая гибридома является клоном, возникшим в результате слияния с единственной В-клеткой, все молекулы антител, которые она производит, по своей структуре идентичны, включая их антиген-связывающий участок и изотип. Моноклональные антитела могут быть также получены с применением других способов, включая EBV-гибридную технологию (см., например, Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74 (2): 361-67 (1984), and Roder et al., Methods Enzymol., 121: 140-67 (1986), экспрессионные векторные системы бактериофага (см., например, Huse et al., Science, 246:1275-81 (1989)), или библиотеки фаг-дисплей, включающие фрагменты антител, такие как Fab и scFv (вариабельная область единичной цепи) (см., к примеру, патенты US 5885793 и 5969108 и международные патентные заявки WO 92/01047 и WO 99/06587).

Моноклональное антитело может быть изолировано из или произведено в любом подходящем животном, но предпочтительно производится у млекопитающих, более предпочтительно у мыши или человека и наиболее предпочтительно у человека. Способы производства антитела у мыши хорошо известны специалисту и описаны здесь. В отношении человеческих антител специалист оценит, что поликлональные антитела могут быть получены из сыворотки субъекта, вакцинированного или иммунизированного подходящим антигеном. Альтернативно человеческие антитела могут быть произведены путем адаптации известных методов производства человеческих антител в ином животном, нежели человек, таком как мышь (см., например, US патенты 5545806, 5569825 и 5714352, а также патентную заявку US 2002/019266 A1).

Хотя человеческие антитела, особенно моноклональные антитела, идеально подходят для применения у людей, их обычно труднее производить, чем мышинные антитела. Однако мышинные моноклональ-

ные антитела индуцируют быстрый ответ хозяина на антитело, когда они вводятся человеку, что может снижать терапевтический или диагностический потенциал конъюгата антитело-лекарственный препарат. Чтобы обойти это осложнение, моноклональное антитело предпочтительно не должно распознаваться как "чужое" иммунной системой организма человека.

С этой целью для получения антител может быть применен метод фаг-дисплей. В этом отношении с применением стандартных методов молекулярной биологии и рекомбинантной ДНК могут быть получены фаговые библиотеки, кодирующие антигенсвязывающие переменные домены (V) домены антител (см., например, Sambrook et al., (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Для специфического связывания с желаемым антигеном выбирается фаг, кодирующий переменную область с желаемой специфичностью, и реконструируется полное человеческое антитело, включающее выбранный переменный домен. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие реконструированное антитело, вводятся в подходящую линию клеток, такую как клетка миелом, применяемая для получения гибридом, так что клеткой секретируются человеческие антитела, имеющие характеристики моноклональных антител (см., например, Janeway et al., *supra*, Huse et al., *supra*, и US патент 6265150). Альтернативно моноклональные антитела могут быть получены из трансгенной мыши со специфическими генами тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека. Такие способы известны специалистам и описаны, например, в US патентах 5545806 и 5569825, а также у Janeway et al., *supra*.

Наиболее предпочтительно антитело является гуманизированным антителом. Как это применяется здесь, "гуманизированное" антитело является антителом, в котором CDR моноклонального антитела мыши, которое образует антигенсвязывающие петли антитела, пересажено на каркас молекулы антитела человека. Принято считать, что благодаря схожести каркасов антител человека и мыши, этот подход дает моноклональное антитело, которое антигенно идентично антителу человека, но связывает тот же антиген, что и моноклональное антитело мыши, из которого происходят CDR последовательности. Способы получения гуманизированных антител хорошо известны специалистам и подробно описаны, например, у Janeway et al., *supra*, патентах US 5225539, 5585089 и 5693761, Европейских патентах 0239400 B1 и патенте Соединенного Королевства Великобритании 2188638. Гуманизированные антитела могут быть также получены с применением технологии замены поверхности антитела, описанной в патентах US 5639641 и у Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235: 959-973 (1994). В то время как антитело, применяемое в иммуноконъюгате композиции изобретения, наиболее предпочтительно является гуманизированным моноклональным антителом, человеческое моноклональное антитело или моноклональное антитело мыши, как это описано выше, также находится в рамках изобретения.

Фрагменты антитела, которые имеют по меньшей мере один антигенсвязывающий участок и, таким образом, распознают и связывают по меньшей мере один антиген или рецептор, представленный на поверхности клетки-мишени, также находятся в рамках изобретения. В этом отношении протеолитическое расщепление интактной молекулы антитела может дать разнообразные фрагменты антитела, которые сохраняют способность распознавать и связывать антигены. Например, ограниченное переваривание молекулы антитела протеазой папаин обычно дает три фрагмента, два из которых идентичны и называются Fab фрагментами, поскольку они сохраняют антигенсвязывающую активность родительской молекулы антитела. Расщепление молекулы антитела ферментом пепсин обычно дает два фрагмента антитела, один из которых сохраняет обе антигенсвязывающие части молекулы антитела и называется F(ab') фрагментом. Восстановление F(ab') фрагмента дитиотреитолом или меркаптоэтиламином дает фрагмент, называемый Fab' фрагментом. Фрагмент переменной области одной цепи (SFv) антитела, который состоит из укороченного Fab фрагмента, включающий переменный (V) домен тяжелой цепи антитела, связанной с V доменом легкой цепи антитела через синтетический пептид, может быть получен с применением рутинных технологий рекомбинантной ДНК (см., например, Janeway et al., *supra*). Подобным образом с применением технологий рекомбинантной ДНК могут быть получены стабилизированные дисульфидными связями фрагменты переменных областей (dsFv) (см., например, Reiter et al., *Protein Engineering*, 7:697-704 (1994)). Фрагменты антитела в контексте изобретения не ограничены, однако, этими данными в примерах типами фрагментов антитела. Может быть применен любой подходящий фрагмент антитела, который распознает и связывает желаемый рецептор поверхности клетки или антиген. Фрагменты антитела дополнительно описаны, к примеру, у Parham. *J. Immunol.*, 131: 2895-2902 (1983), Spring et al., *J. Immunol.*, 113:470-478 (1974) и Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960). Связывание антиген-антитело можно оценить с применением любого подходящего способа, известного специалисту, такого, к примеру, как радиоиммуноанализ, ELISA, Вестерн-блот, иммунопреципитация и анализ конкурентного ингибирования (см., к примеру, Janeway et al., *supra*, и заявку на US патент 2002/0197266 A1).

Кроме того, антитело может быть химерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Термин "химерное" обозначает, что антитело включает по меньшей мере два иммуноглобулина или их фрагменты, полученные или происходящие по меньшей мере из двух различных видов (например, двух различных иммуноглобулинов, таких как константная область иммуноглобулина человека в сочетании с переменной областью иммуноглобулина мыши). Антитело также может быть доменом антитела (dAb)

или его антигенсвязывающим фрагментом, таким, к примеру, как антитело верблюдовых (см., например, Desmyter et al. *Nature Struct. Biol.*, 3:752 (1996) или антитело акулы, такое, к примеру, как новый рецептор антигена (IgNAR) (см., например, Greenberg et al., *Nature*, 374:168 (1995) и Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

В контексте изобретения может быть применено любое подходящее антитело. Например, моноклональное антитело J5 представляет собой мышиное IgG2 антитело, которое является специфичным по отношению к общему антигену острой лимфобластной лейкемии (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283:583-585 (1980) и может применяться по отношению к клеткам, которые экспрессируют CALLA (например, клетки острой лимфобластной лейкемии). Моноклональное антитело MY9 представляет собой мышиное IgG1 антитело, которое специфически связывается с антигеном CD33 (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8:521 (1984) и может применяться для направления к клеткам, которые экспрессируют CD33 (например, клеткам острой миелогенной лейкемии (AML)).

Подобным образом моноклональное антитело anti-B4 (называемое также B-4) представляет собой мышиное IgG1 антитело, которое связывается с антигеном CD19 на В-клетках (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983) и может применяться для направления к В-клеткам или большим клеткам, которые экспрессируют CD19 (например, клетки не-ходжкиновской лимфомы и клетки хронической лимфобластной лейкемии). N901 представляет собой мышиное антитело, которое связывается с антигеном CD56 (молекула адгезии нейрональных клеток), обнаруженной на клетках нейроэндокринного происхождения, включая клетки мелкоклеточного рака легких, которое может применяться в иммуноконъюгатах для направления лекарств к клеткам нейроэндокринной природы. Антитела J5, My9 и B4 предпочтительно являются антителами с реконструированной поверхностью или гуманизированными перед их использованием как части иммуноконъюгата. Реконструирование поверхности или гуманизация антител описаны, например, у Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-73 (1994).

Кроме того, моноклональное антитело C242 связывает антиген CanAg (см. US патент 5552293) и может применяться для направления иммуноконъюгата к опухолям, экспрессирующим CanAg, таким как клетки колоректального рака, рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легких и рака желудка. HuC242 представляет собой гуманизированную форму моноклонального антитела C242 (см., например, US патент 5552293). Гибридома, из которой получают HuC242, находится на хранении с ECACC идентификационным номером 90012601. HuC242 можно получить с применением методологии пересадки CDR (см., например, US патенты 5585089 и 5693762) или методологии реконструирования поверхности (см., к примеру, патент US 5639641). HuC242 можно применять для направления иммуноконъюгата к опухолевым клеткам, экспрессирующим антиген CanAg, таким, например, как клетки колоректального рака, рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легких и рака желудка.

Для направления к клеткам рака яичника и рака простаты в качестве компонента иммуноконъюгата может применяться антитело анти-MUC1, обеспечивающие связывание с раковыми клетками. Антитела анти-MUC1 включают, к примеру, анти-HMFG-2 (см., например, Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTM01 (см., например, van Hof et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996) и DS6. К клеткам рака простаты могут направляться также иммуноконъюгаты за счет применения специфического, направленного против простаты, мембранного антигена (PSMA) в качестве агента связывающегося с раковой клеткой, такого как J591 (см., например, Liu et al., *Cancer Res.*, 57:3629-3634 (1997). Более того, к клеткам рака, которые экспрессируют антиген HER2, такие как клетки рака груди, простаты и яичника, лекарства могут направляться с применением антитела трастузумаб. В иммуноконъюгатах могут также применяться анти-IGF-IR антитела, которые связываются с рецептором инсулиноподобного фактора роста.

Особенно предпочтительными антителами являются гуманизированные моноклональные антитела, примеры которых включают huN901, huMy9-6, huB4, huC242, DS6, трастузумаб, биватузумаб, сибротузумаб и ритуксимаб (см., например, патенты US 5639641 и 5665357, публикации заявок на US патенты 2005-0118183 A1, международная патентная заявка WO 02/16401, Pedersen et al., *supra*, Roguska et al., *supra*, Liu et al., *Eur. J. Cancer*, 31A:2385-2391, Welt et al., *J. Clin Oncol.*, 12:1193-1203 (1994), и Maloney et al., *Blood*, 90:2188-2195 (1997). Более предпочтительно, когда антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело huN901 или гуманизированное моноклональное антитело huMy9-6. Специалистам известны другие гуманизированные моноклональные антитела, и они могут применяться в связи с этим изобретением.

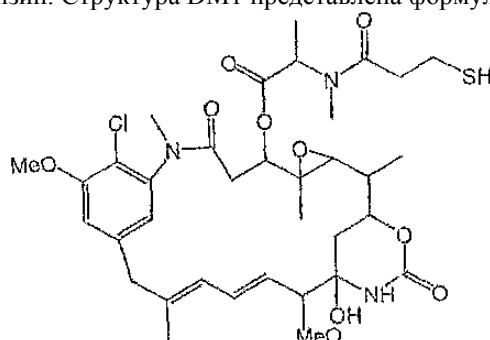
Иммуноконъюгат может включать любое подходящее лекарство, обычно цитотоксический агент. "Цитотоксический агент", как это применяется здесь, относится к любому соединению, которое приводит к смерти клетки или к снижению жизнеспособности клетки. Подходящие цитотоксические агенты включают, к примеру, мейтанзиноиды и аналоги мейтанзиноидов, таксоиды, CC-1065 и аналоги CC-1065, а также доластатин и аналоги доластатина. В предпочтительном воплощении изобретения цитотоксический агент является мейтанзиноидом, включая мейтанзиноид и аналоги мейтанзиноида. Мейтанзиноиды представляют собой соединения, которые ингибируют образование микротрубочек и являются очень токсичными по отношению к клеткам млекопитающих. Примеры подходящих аналогов мейтанзиноидов включают те, что имеют модифицированное ароматическое кольцо, и те, что имеют модифика-

ции в других позициях. Такие мейтанзиноиды описаны, например, в US патентах 4256746, 4294757, 4307016, 4313946, 4315929, 4322348, 4331598, 4361650, 4362663, 4364866, 4424219, 4371533, 4450254, 5475092, 5585499, 5846545 и 6333410.

Примеры аналогов мейтанзинола, имеющие модифицированное ароматическое кольцо, включают: (1) C-19-дехлоро (патент US 4256746) (получен восстановлением анзамитоцина P2), (2) C-20-гидрокси (или C-20 деметил) +/- C-19-дехлоро (патенты US 4361650 и 4307016), полученный деметилированием с применением *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорированием с применением LАН) и (3) C-20-деметокси, C-20-ацилокси (-OCOR), +/- дехлоро (US патент 4294757 (получен ацилированием с применением ацилхлоридов).

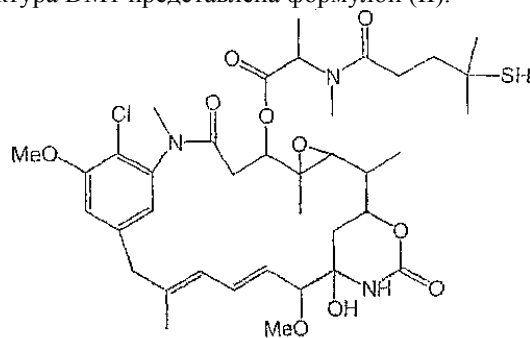
Примеры аналогов мейтанзинола, имеющие модификации в иных позициях, чем ароматическое кольцо, включают: (1) C-9-SH (US патент 4424219) (получен за счет реакции мейтанзинола с H_2S или P_2S_5), (2) C-14-алкоксиметил (деметокси/ CH_2OR (US патент 4331598), (3) C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH_2OH или CH_2OAc) (US патент 4450254) (получено из *Nocardia*), (4) C-15-гидрокси/ацилокси (US патент 4364866) (получен путем превращения мейтанзинола в *Streptomyces*), (5) C-15-метокси (US патенты 4313946 и 4315929) (выделено из *Trewia nudiflora*), (6) C-18-N-деметил (US патенты 4362663 и 4322348) (получено деметилированием мейтанзинола в *Streptomyces*) и (7) 4,5-деокси (US патент 4371533) (получен путем восстановления мейтанзинола трихлоридом титана/ЛАН).

В предпочтительном воплощении изобретения в иммуноконъюгате в качестве цитотоксического агента используется тиолсодержащий мейтанзиноид DM1, известный также как N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)мейтанзин. Структура DM1 представлена формулой (I).



(I)

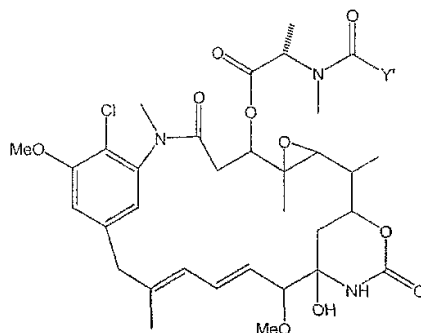
В другом предпочтительном воплощении изобретения в иммуноконъюгате в качестве цитотоксического агента используется DM4, известный так же как N-2'-деацетил-N-2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)мейтагоин. Структура DM1 представлена формулой (II).



(II)

В контексте изобретения могут применяться другие мейтанзиноиды, включая, например, тиол- и дисульфидсодержащие мейтанзиноиды, несущие моно- или диалкил-заместители у атома углерода, несущего атом серы. Особенно предпочтительными являются мейтанзиноиды, имеющие в позиции C_3 , C_{14} гидроксиметил, C_{15} - гидрокси или C_{20} - десметил, ацилированную аминокислотную боковую цепь с ацильной группой, несущей блокированную сульфгидрильную группу, где атом углерода ацильной группы, несущий тиол, имеет один или два заместителя, названные заместители являются CH_3 , C_2H_5 , линейным или разветвленным алкилом или алкенилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, циклическим алкилом или алкенилом, имеющим от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, где дополнительно один из заместителей может быть H и где ацильная группа имеет линейную цепь длиной по меньшей мере в три атома углерода между карбонильной группировкой и атомом серы.

Дополнительные мейтанзиноиды для применения в контексте изобретения включают соединения, представленные формулой (III)



(III),

где Y' представляет $(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_t(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_n-CR_1R_2SZ$,

R_1 и R_2 - это каждый независимо линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH_3 или C_2H_5 , разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и где R_2 может быть также H,

A, B, D - это циклоалкил или циклоалкенил, имеющий 3-10 атомов углерода, простой или замещенный арил, или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$ и R_{12} - это каждый независимо H, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH_3 или C_2H_5 , разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l, m, n, p, q, r, s, u и t - это каждый независимо 0 или целое число от 1 до 5 при условии, что по меньшей мере два из l, m, n, p, q, r, s, u и t не являются 0 одновременно, и

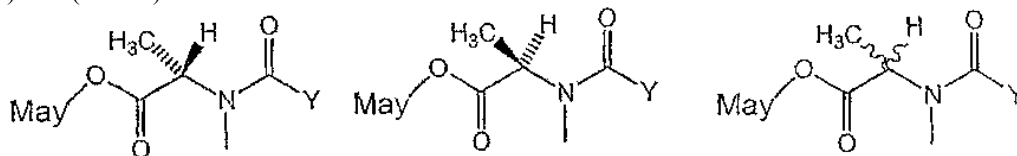
Z - это H, SR или COR,

R - это линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал.

Предпочтительные воплощения формулы (III) включают соединения формулы (III),

где (a) R_1 - это H, R_2 - это метил и Z - это H, (b) R_1 и R_2 - это метил и Z - это H, (c) R_1 - это H, R_2 - это метил и Z - это SCH_3 , и (d) R_1 и R_2 - это метил и Z - это SCH_3 .

Такие дополнительные мейтанзины включают также соединения, представленные формулами (IV-L), (IV-D) или (IV-DL)



(IV-L)

(IV-D)

(IV-D,L)

где Y представляет $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

R_1 и R_2 - это каждый независимо H, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH_3 или C_2H_5 , разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 и R_8 - это каждый независимо H, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH_3 или C_2H_5 , разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l, m и n - это каждый независимо 0 или целое число от 1 до 5, и n дополнительно может быть равным 0,

Z - это H, SR или COR,

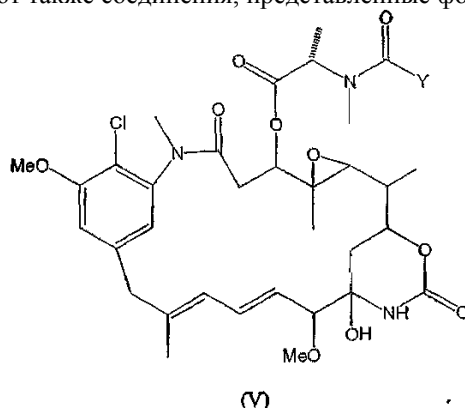
R - это метил, линейный или разветвленный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, или простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и

May представляет мейтанзиноид, который несет боковую цепь в положениях C-3, C-14 гидроксиметил, C-15 гидроксид или C-20 десметил.

Предпочтительные воплощения формул (IV-L), (VI-D) и (IV-D,L) включают соединения формул (IV-L), (VI-D) и (IV-D,L), где (a) R_1 - это H, R_2 - это метил, каждый из R_5, R_6, R_7 и R_8 каждый - это H, l и m каждый - это l, n - это 0, и Z - это H, (b) R_1 и R_2 - это метил, R_5, R_6, R_7 и R_8 каждый - это H, l и m - это l,

n - это 0, и Z - это H, (с) R₁ - это H, R₂ - это метил, каждый из R₅, R₆ и R₇ и R₈ каждый - это H, l и m каждый - это l, n - это 0, и Z - это SCH₃, или (d) R₁ и R₂ - это метил, каждый из R₅, R₆ и R₇ и R₈ - это H, l и m каждый - это l, n - это 0 и Z - это SCH₃.

Предпочтительно цитотоксический агент представлен формулой (IV-L). Дополнительные предпочтительные мейтанзины включают также соединения, представленные формулой (V)



где Y представляет (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,

где R₁ и R₂, каждый независимо, - это H, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH₃ или C₂H₅, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈, каждый независимо, - это H, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH₃ или C₂H₅, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

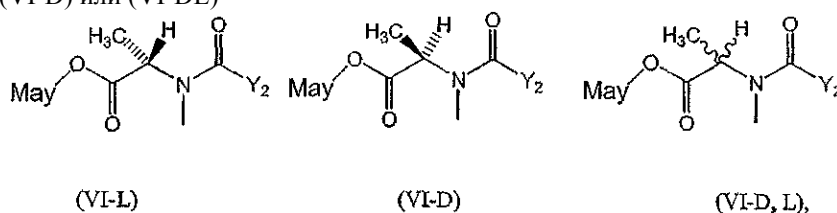
l, m и n, каждый независимо, - это 0 или целое число от 1 до 5, и n дополнительно может быть равным 0, и

Z - это H, SR или COR,

R - это метил, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, или простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал.

Предпочтительные воплощения формулы (V) включают соединения формулы (V), где (a) R₁ - это H, R₂ - это метил, каждый R₅, R₆ и R₇ и R₈ - это H, l и m каждый - это l, n - это 0, и Z - это H, (b) R₁ и R₂ - это метил, R₅, R₆, R₇ и R₈ каждый - это H, l и m - это l, n - это 0, и Z - это H, (с) R₁ - это H, R₂ - это метил, каждый из R₅, R₆, R₇ и R₈ - это H, l и m каждый - это l, n - это 0, и Z - это SCH₃, или (d) R₁ и R₂ - это метил, каждый из R₅, R₆ и R₇ и R₈ - это H, l и m каждый - это l, n - это 0, и Z - это SCH₃.

Еще дополнительные предпочтительные мейтанзины включают соединения, представленные формулами (VI-L), (VI-D) или (VI-DL)



где Y₂ представляет (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,

R₁ и R₂, каждый независимо, - это линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH₃ или C₂H₅, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и где R₂ может также быть H,

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈, каждый независимо, - это H, линейный циклический алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH₃ или C₂H₅, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

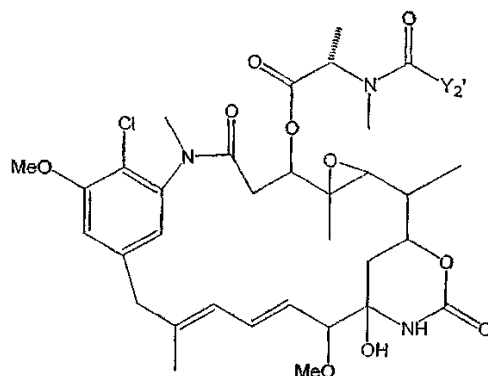
l, m и n - это, каждый независимо, 0 или целое число от 1 до 5, и n дополнительно может быть равным 0, и

Z₂ - это H, SR или COR,

R - это линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, или простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и

Мау - это мейтанзиноид.

Дополнительно предпочтительные мейтанзиноиды включают соединения, представленные формулой (VII)



(VII),

где Y_2' представляет $(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_t(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

R_1 и R_2 , каждый независимо, - это H, линейный разветвленный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH_3 или C_2H_5 , циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

A, B и D, каждый независимо, - это циклоалкил или циклоалкенил, имеющий 3-10 атомов углерода, простой или замещенный арил, или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$ и R_{12} , каждый независимо, - это H, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, предпочтительно CH_3 или C_2H_5 , разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l, m, n, p, q, r, s, t и u, каждый независимо, - это 0 или целое число от 1 до 5 при условии, что по меньшей мере два из l, m, n, p, q, r, s, t и u не являются 0 одновременно,

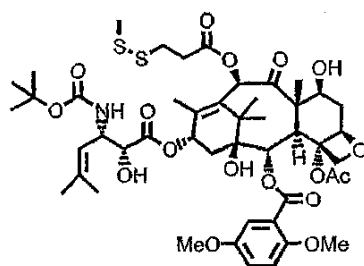
Z - это SR или -COR,

R - это линейный алкил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал.

Предпочтительные воплощения формулы (VII) включают соединения формулы (VII), где R_1 - это H, а R_3 - это метил.

В дополнение к мейтанзиноидам цитотоксический агент, применяемый в иммуноконъюгате, может быть таксаном или его производным. Таксаны - это семейство соединений, которое включает паклитаксел (Taxol®), природный цитотоксический продукт, и доцетаксел (Taxotere®), полусинтетическое производное, оба из которых широко применяются при лечении рака. Таксаны являются митотическими ядами, влияющими на веретено деления, которые ингибируют деполимеризацию тубулина, что приводит к смерти клетки. Хотя доцетаксел и паклитаксел являются агентами, полезными при лечении рака, их противоопухолевая активность ограничена из-за их неспецифической токсичности по отношению к нормальным клеткам. Кроме того, соединения, подобные паклитакселу и доцетакселу, сами по себе не являются достаточно сильными для применения в иммуноконъюгатах.

Предпочтительным таксаном для применения в приготовлении цитотоксического иммуноконъюгата является таксан формулы (VIII)



(VIII)

Способы синтеза таксанов, которые могут применяться в контексте изобретения вместе со способами конъюгации таксанов с агентами, связывающимися с клеткой, такими как антитела, подробно описаны в US патентах 5416064, 5475092, 6340701, 6372738, 6436931, 6596757, 6706708 и 6716821, а также в публикации заявки на US патент 2004/0024049 A1.

Цитотоксическим агентом может быть также CC-1065 или его производное. CC-1065 является мощным противоопухолевым антибиотиком, выделенным из культурального бульона *Streptomyces zelenis*. CC-1065 обладает *in vitro* примерно в 1000 раз более сильным действием, чем обычно применяемые противораковые лекарства, такие как доксорубин, метотрексат и винкристин (Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42:3532-3537 (1982)). CC-1065 и его аналог раскрыты в US патентах: 5585499, 5846545, 6340701 и 6372738. Цитотоксическая мощность CC-1065 коррелировала с его алкилирующей активностью, а также с его ДНК-связывающей и ДНК-интеркалирующей активностью. Эти две активности находятся в различных частях молекулы. В этом отношении алкилирующая активность включена в циклопропапирролиндольную (CPI) субъединицу, а ДНК-связывающая активность находится в двух пирроиндольных субъединицах CC-1065.

Специалистам известно несколько аналогов CC-1065, которые также могут применяться в качестве цитотоксического агента в иммуноконъюгате (см., например, Warpehoski et al., *J. Med.Chem.*, 31:590-603 (1988)). Были разработаны серии аналогов CC-1065, в которых CPI компонент замещается циклопропабензиндольным (CBI) компонентом (Boger et al., *J. Org.Chem.*, 55:5823-5833 (1990) и Boger et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1:115-120 (1991)). Эти аналоги CC-1065 обеспечивают *in vitro* высокую эффективность родительского соединения, не вызывая замедленной токсичности у мышей. Подобно CC-1065 эти соединения являются алкилирующими агентами, которые ковалентно связываются с малой бороздой ДНК, вызывая смерть клетки.

Терапевтическая эффективность аналогов CC-1065 может быть значительно увеличена путем изменения распределения его *in vivo* благодаря направленной доставке к участку опухоли, приводя к более низкой токсичности в тканях, которые не являются мишенями, и, таким образом, к меньшей системной токсичности. С этой целью получены конъюгаты аналогов и производных CC-1065 с агентами, связывающимися с клетками, которые специфически направлены на опухолевые клетки (см., например, US патенты 5475092, 5585499 и 5846545). Эти конъюгаты обычно проявляют *in vitro* высокую направленную на мишень цитотоксичность и противоопухолевую активность в модели трансплантата человеческой опухоли на мышах (см., к примеру, Chari et., *Cancer Res.*, 55:4079-4084 (1995)).

Способы синтеза аналогов CC-1065 подробно описаны в US патентах 5475092, 5585499, 5846545, 6534660, 6586618 и 6756397 и публикации заявки на US патент 2003/0195365 A1.

Лекарственные агенты, такие как метотрексат, даунорубин, доксорубин, винкристин, винбластин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, калихеамицин, тубулизин и аналоги тубулизина, дуокармицин и аналоги дуокармина, доластатин и аналоги доластатина также могут применяться в контексте изобретения. Соединения доксорубина и даунорубина (см., например, US патент 6630579) также могут применяться в качестве лекарственного агента.

Иммуноконъюгаты могут быть получены методами *in vitro*, для того чтобы связать лекарство или пролекарство с антителом, может быть применена линкерная группа. Подходящие линкерные группы хорошо известны специалистам и включают дисульфидные группы, кислотолабильные группы, фотолабильные группы, группы, лабильность которых обеспечивается пептидазами и эстеразами. Предпочтительными линкерными группами являются дисульфидные группы. Например, иммуноконъюгаты могут быть сконструированы с применением дисульфидных реакций обмена между антителом и лекарством или пролекарством. Молекулы лекарства могут быть также связаны с антителом через промежуточную молекулу переносчика, такую как сывороточный альбумин.

Антитело может быть модифицировано реакцией с бифункциональным сшивающим реагентом, что приводит к ковалентному прикреплению линкерной молекулы к антителу. Как это применяется здесь, "бифункциональный сшивающий реагент" является любой химической группировкой, которая ковалентно связывает агент, взаимодействующий с клеткой, с лекарством, таким как лекарства, описанные здесь. В предпочтительном воплощении изобретения часть связующего компонента обеспечивается лекарством. В этом отношении лекарство включает связывающий компонент, который является частью большей связывающей молекулы, такой что применяется для соединения антитела с лекарством. Например, для образования мейтанзиноида DM1, боковая цепь при C3 гидроксильной группе мейтанзина модифицируется с получением свободной сульфгидрильной группы (SH). Эта тиолированная форма мейтанзина может реагировать с модифицированным антителом с образованием иммуноконъюгата. Таким образом, конечный линкер образуется из двух компонентов, один из которых обеспечивается кросс-сшивающим агентом, в то время как другой - боковой цепью DM1.

В связи с изобретением может применяться любой подходящий бифункциональный сшивающий реагент до тех пор, пока линкерный реагент обеспечивает сохранение терапевтических, например цитотоксичности, и направляющих характеристик лекарства и антитела соответственно. Предпочтительно молекула линкера соединяет лекарство с антителом через химическую связь (как описано выше) так, что лекарство и антитело сопряжены химически (например, связаны ковалентно) друг с другом. Предпочтительно связывающий реагент является расщепляемым линкером. Более предпочтительно линкер расщепляется в мягких условиях, т.е. в условиях, характерных для клетки, в которых активность лекарства не изменяется. Примеры подходящих расщепляемых линкеров включают дисульфидные линкеры, кислотолабильные линкеры, фотолабильные линкеры и линкеры, расщепляемые пептидазами и эстеразами. Лин-

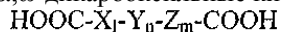
керы, включающие дисульфиды, являются линкерами, расщепляемые благодаря дисульфидному обмену, который может происходить в физиологических условиях. Кислотолабильные линкеры являются линкерами, расщепляемыми при кислых pH. Например, определенные внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и лизосомы, имеют кислый pH (pH 4-5) и обеспечивают условия, подходящие для расщепления кислотолабильных линкеров. Фотоллабильные линкеры полезны на поверхности тела и во многих полостях тела, которые доступны свету. Кроме того, инфракрасный свет может проникать в ткани. Расщепляемые пептидазами линкеры могут быть полезны для расщепления определенных пептидов внутри или снаружи клетки (см., например, Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 626-629 (1982) и Unemoto et al., Int. J. Cancer, 43: 677-684 (1989)).

Предпочтительно лекарство связано с антителом через дисульфидную связь. Молекула линкера включает реактивную химическую группу, которая может реагировать с антителом. Предпочтительными реактивными химическими группами для реакции с антителом являются N-сукцинимидиловые эфиры и N-сульфосукцинимидиловые эфиры. Дополнительно линкерные молекулы включают реакционноспособную химическую группу, предпочтительно дитиопиридилную группу, которая может реагировать с лекарством с образованием дисульфидной связи. Особенно предпочтительные линкерные молекулы включают, например, N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (см., например, Carlsson et al., Biochem. J., 173:732-737 (1978), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB) (см., например, US патент 4563304) и N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP) (см., например, CAS Регистрационный номер 341498-08-6).

Хотя в изобретении предпочтительно применяются расщепляемые линкеры, для получения описанного выше конъюгата могут также применяться нерасщепляемые линкеры. Нерасщепляемые линкеры являются любым химическим компонентом, который способен стабильным образом через ковалентную связь связывать лекарство, такое как мейтанзиноид, таксан или аналог CC-1065, с агентом, связывающимся с клеткой, таким как антитело. Таким образом, нерасщепляемые линкеры являются, по существу, устойчивыми к расщеплению в кислоте, на свету, под действием пептидаз и эстераз и к расщеплению дисульфидной связи в условиях, когда лекарство и антитело остаются активными.

Подходящие кросс-сшивающие реагенты, которые формируют нерасщепляемые линкеры между лекарством и агентом, связывающимся с клеткой, хорошо известны специалистам. Примеры нерасщепляемых линкеров включают линкеры, имеющие компонент в виде эфира N-сукцинимидила или эфира N-сульфосукцинимидила для реакции с агентом, связывающимся с клеткой, а также основанные на малеимиде или галогенацетиле компоненты для реакции с лекарством. Кросс-сшивающие реагенты, включающие основанные на малеимиде компоненты, включают N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), κ -малеимидундекановой кислоты N-сукцинимидиловый эфир (KMUA), γ -малеимидомасляной кислоты N-сукцинимидиловый эфир (GMBS), ϵ -малеидокапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидиловый эфир (EMCS), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), N-(α -малеимидоацетокси)-сукцинимидиловый эфир (AMAS), сукцинимидил-6-(β -малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), (N-сукцинимидил 4-(p-малеимидофенил)бутират (SMPB) и N-(p-малеимидофенил)изотиоцианат (PMPI). Кросс-сшивающие реагенты, включающие компонент на основе галогенацетила, включают N-сукцинимидил-4-(иодоацетил)аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил иодоацетат (SIA), N-сукцинимидил бромоеацетат (SBA) и N-сукцинимидил 3-(бромоеацетамидо)пропионат (SBAP).

Другие кросс-сшивающие агенты без атома серы, которые образуют нерасщепляемые линкеры, также могут применяться в способе изобретения. Такие линкеры могут происходить из компонентов, основанных на дикарбоксильных кислотах. Подходящие компоненты на основе дикарбоксильных кислот включают, но не ограничиваются этим, α, ω -дикарбоксильные кислоты с общей формулой (IX)



(IX)

где X - это линейный или разветвленный алкил, алкенил или алкинильная группа, имеющая от 2 до 20 атомов углерода,

Y - это циклоалкил или циклоалкенильная группа, несущая от 3 до 10 атомов углерода,

Z - это замещенная или незамещенная ароматическая группа, несущая от 6 до 10 атомов углерода,

Z - это замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где гетероатом выбран из N, O или S, и

l, m и n каждый равен 0 или 1, при условии, что все l, m и n не равны 0 в одно и то же время.

Многие из нерасщепляемых линкеров, раскрытых здесь, в подробностях описаны в публикации патентной заявки US 2005/0169933 A1.

Альтернативно, как раскрыто в US патенте 6441163 B1, лекарство сначала может быть модифицировано для введения реакционноспособного эфира, подходящего для реакции с антителом. Реакция этих мейтанзиноидов, включающих активированный линкерный компонент, с антителом обеспечивает другой способ получения расщепляемого или нерасщепляемого конъюгата антитело-мейтанзиноид.

Способы производства таких фармацевтических композиций вовлекают буфер, обменивающий большую часть фармацевтического агента в буфер подходящей композиции путем хроматографии или диафильтрации, а затем добавление подходящих эксципиентов в желаемых количествах, в виде раствора или твердого вещества. Для получения желаемой композиции может быть проведено конечное доведение концентрации белка и/или pH.

Иммуноконъюгаты изобретения вводятся пациенту в форме фармацевтической композиции, описанной в этом изобретении, и фармацевтически приемлемого носителя, эксципиента или дилуэнта. Как это применяется здесь, "фармацевтически приемлемые" относится к таким агентам, которые полезны для лечения или постановки диагноза у млекопитающих, предпочтительно у человека. Предпочтительный способ введения является парентеральным, особенно внутривенным, внутримышечным, подкожным, внутрибрюшинным или внутрилимфатическим путем. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980. Mack Publishing Company, edited by Osol et al. Такие композиции могут включать белки, такие как сывороточные белки, например человеческий сывороточный альбумин, буферы или буферные вещества, такие как фосфаты, другие соли, или электролиты и т.п. Подходящие дилуэенты могут включать, например, стерильную воду, изотонический солевой раствор, разведенную водную декстрозу, полигидридные спирты или смеси таких спиртов, например глицерин, пропиленгликоль, PEG и т.п. Композиции могут включать консерванты, такие как фенилэтиловый спирт, метиловый и пропиловый парабены и т.п. Если желательно, композиция может включать от 0,05 до 0,20 вес.% антиоксиданта.

Введение может осуществляться любым путем, который известен как эффективный обычному врачу. Парентеральное введение является предпочтительным. Предпочтительный парентеральный способ введения композиции настоящего изобретения включает внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, внутриартериальный. Внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный и подкожный пути введения соединений, применяемых в настоящем изобретении, являются более предпочтительными парентеральными путями введения. Внутривенный, внутрибрюшинный и подкожный пути введения композиций настоящего изобретения являются еще более предпочтительными.

Введение определенными парентеральными путями может вовлекать введение композиций настоящего изобретения в тело пациента иглой или катетером. Необязательно такое введение может осуществляться стерильным шприцом или каким-либо другим механическим устройством, таким как непрерывная система вливания. Композиция, обеспечиваемая настоящим изобретением, может быть введена с применением шприца, инжектора, насоса или любого другого механического устройства или управляемого силой тяжести устройства, известного в искусстве парентерального введения. Композиция может быть введена парентерально в стерильной жидкой форме дозировки. Эти композиции могут вводиться внутривенно в виде болюса или быстрой инфузии, которая может в дополнение к их желаемому терапевтическому, диагностическому или медицинскому эффекту вызывать освобождение иммуноконъюгата.

Иммуноконъюгаты изобретения являются эффективными в широком ряду дозировок в зависимости от факторов, таких как: состояние заболевания, которое лечится, или биологического эффекта, который модифицируется, способа, которым иммуноконъюгат вводится, возраста, веса и состояния пациента, а также других факторов, которые определяются лечащим врачом. Таким образом, количество вводимого любому данному пациенту композиции иммуноконъюгата может быть определено на индивидуальной основе.

Количество композиции настоящего изобретения, которое вводится для лечения пациента, может зависеть от ряда факторов, среди которых (без ограничения) пол пациента, вес и возраст, причины, лежащие в основе состояния или заболевания, которое лечится, способ введения и биодоступность, устойчивость введенного иммуноконъюгата в организме, композиции и эффективности иммуноконъюгата. Когда введение прерывается, количество иммуноконъюгата на введение также должно принимать во внимание интервал между дозами и биодоступность иммуноконъюгата данной композиции. Введение композиции настоящего изобретения должно быть непрерывным. В пределах умения обычного врача определить дозу и скорость введения или частоту введения композиции настоящего изобретения для достижения желаемого клинического результата.

Вводимые дозировки, конечно, будут варьировать в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики определенного агента, и его способ или путь введения, возраста, состояния здоровья и веса реципиента, природы и степени симптомов, типа сопутствующего лечения, частоты лечения и желаемого эффекта. Обычно ежедневная дозировка терапевтически значимого соединения может быть около 0,1-100 мг на 1 кг веса тела.

Форма дозировки, подходящая для внутреннего введения, включает примерно 1-50 мг терапевтически значимого соединения на единицу. В этих терапевтических композициях терапевтически значимое соединение обычно будет представлено в количестве примерно 0,05-2 вес.% в жидкой композиции и 2-50% в лиофилизированной композиции до реконструкции на основе общего веса композиции.

Настоящее изобретение обеспечивает также лиофилизированный порошок описанной выше композиции. Предпочтительно лиофилизированная композиция включает один или более дополнительных компонентов, таких как лиопротектант и/или наполняющий агент. Лيوфилизированный порошок может быть восстановлен водой для создания реконструированного раствора. Настоящая композиция может

быть лиофилизирована и восстановлена, как описано в публикации заявки на US патент 2004/0241174 A1, описание которой, таким образом, включено сюда путем ссылки, которая описывает лиофилизированные композиции, включающие иммуноконъюгаты.

Перед восстановлением лиофилизированной композиции относительное количество каждого компонента, включенного в лиофилизированную композицию изобретения, может быть описано в терминах мг эксципиента (например, буфера, сурфактанта, наполнителя, криопротектора) на мг конъюгата.

Хотя может применяться любой буферный агент, описанный здесь в связи с лиофилизированной композицией изобретения, лиофилизированная композиция предпочтительно включает в качестве буфера сукцинат натрия. Буферный агент может быть представлен в лиофилизированной композиции изобретения в любом подходящем количестве. В частности, лиофилизированная композиция желательна включает примерно 0,1-2 мг буферного агента на мг конъюгата (например, примерно от 0,1 до 0,5 мг буферного агента на мг конъюгата, примерно 0,5-1 мг буферного агента на мг конъюгата, или примерно 1-2 мг буферного агента на мг конъюгата). Наиболее предпочтительно лиофилизированная композиция включает примерно 0,3 мг сукцината натрия на мг конъюгата.

Желательно лиофилизированная композиция включает примерно 0,005-0,1 мг полисорбата на мг конъюгата и предпочтительно примерно 0,005-0,1 мг полисорбата на мг конъюгата, примерно 0,01-0,05 мг полисорбата на мг конъюгата или примерно 0,1 мг полисорбата на мг конъюгата. Когда полисорбат - это полисорбат 20, лиофилизированная композиция предпочтительно включает примерно 0,02-20 мг полисорбата на мг конъюгата.

Для предотвращения деградации активных ингредиентов композиции во время замораживания и высушивания лиофилизированная композиция изобретения дополнительно включает криопротектор, предпочтительно аморфный криопротектор. Термин "криопротектор", как он применяется здесь, относится к эксципиенту, который защищает нестабильные молекулы во время замораживания. Подходящие криопротекторы для применения в лиофилизированной композиции известны специалистам и включают, например, глицерин, диметилсульфоксид (DMSO), PEG, декстран, глюкозу, трегалозу и сахарозу. Наиболее предпочтительным криопротектором является сахароза. Криопротектор может быть представлен в лиофилизированной композиции изобретения в любом подходящем количестве. Желательно, когда лиофилизированная композиция включает примерно 0,5-5 мг, например примерно 0,5-2 мг криопротектора на мг конъюгата, примерно 0,8 мг криопротектора на мг конъюгата, примерно 2 мг криопротектора на мг конъюгата или примерно 4 мг криопротектора на мг конъюгата. Когда криопротектором является сахароза, лиофилизированная композиция предпочтительно включает примерно 0,5-2 мг (например, примерно 1 мг) сахарозы на мг конъюгата.

Лиофилизированная композиция дополнительно может включать наполнитель, предпочтительно кристаллизующийся наполнитель. Обычно наполнитель применяется для обеспечения структуры и веса "таблетки", получаемой в результате лиофилизации. Любой подходящий наполнитель, известный специалисту, может применяться в связи с лиофилизированной композицией изобретения. Подходящие наполнители включают, например, маннитол, декстран и глицин. Наполнителем, применяемым в композиции изобретения, наиболее предпочтительно является глицин. Лиофилизированная композиция может включать любое подходящее количество наполнителя, но предпочтительно лиофилизированная композиция включает примерно 2-20 мг наполнителя на мг конъюгата и предпочтительно примерно 2-10 мг наполнителя на мг конъюгата, примерно 5-10 мг наполнителя на мг конъюгата, примерно 10-15 мг наполнителя на мг конъюгата или примерно 15-20 мг наполнителя на мг конъюгата. Когда наполнителем является глицин, лиофилизированная композиция предпочтительно включает примерно 3,8 мг глицина на мг конъюгата.

Таким образом, в соответствии с изобретением, содержимое лиофилизированной композиции, которая должна быть восстановлена до раствора, включающего 5 мг/мл конъюгата (например, предпочтительно конъюгата, включающего huN901, химически сопряженного с DM1), предпочтительно включает (i) примерно 0,3 мг сукцината натрия на мг конъюгата в качестве буфера, (ii) примерно 0,02 мг полисорбата 20 на мг конъюгата, (iii) примерно 1 мг сахарозы на мг конъюгата, и (iv) примерно 3,8 мг глицина на мг конъюгата. Один раз реконструированная водой такая лиофилизированная композиция предпочтительно имеет pH примерно 5,5. Более того, когда лиофилизированная композиция реконструируется водой, описания относительных концентраций эксципиентов, данные выше в связи с жидкой композицией, применимы к вышеназванной лиофилизированной композиции.

Способы лиофилизации хорошо известны специалисту и описаны, например, у Wang, W., Int. J. Pharm., 203, 1-60 (2000). К примеру, лиофилизированная композиция изобретения может быть получена с применением цикла лиофилизации, включающего следующие стадии: (1) переохлаждение при температуре 4°C и давлении окружающей среды в камере в течение 2,5 ч, (2) замораживание при температуре -50°C и давлении окружающей среды в камере в течение 14 ч, (3) рекристаллизация глицина при температуре -20°C и давлении окружающей среды в камере в течение 16 ч, (4) повторное замораживание при температуре -50°C и давлении окружающей среды в камере в течение 16 ч, (5) первичное высушивание при температуре -13°C и давлении 100 mTorr в течение 24 ч, (6) вторичное высушивание при температу-

ре 24°C и давлении 100 мТогг в течение 10 ч, и (7) конечная фаза при температуре 24°C и давлении окружающей среды в камере. Лиофилизированная композиция, однако, не ограничивается композициями, получаемыми описанным выше способом. Действительно, для получения лиофилизированной композиции может быть применен любой подходящий способ лиофилизации, и это будет очевидно специалисту, который будет варьировать выбранные параметры лиофилизации (например, время сушки) в зависимости от многих факторов, включая объем раствора, который подвергается лиофилизации.

В другом воплощении настоящее изобретение направлено на набор для приготовления водной композиции, который включает первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, и второй контейнер, содержащий водную композицию, включающую стабилизатор восстановления. Концентрация лиофилизированного порошка в растворе, объем раствора, который помещается в каждый контейнер, и емкость контейнеров представляют собой взаимосвязанные параметры, которые могут быть модифицированы подходящим образом в зависимости от желаемой концентрации активного элемента в конечной единице дозирования. Таким образом, эти параметры могут варьировать в широком ряду.

Все патенты, публикации и другие ссылки, цитированные здесь, определенно включены сюда путем ссылки в их целостности.

Настоящее изобретение дополнительно описано следующими примерами, которые иллюстрируют способ, и не должны быть истолкованы как лимитирующие изобретение. Параметры способа, данные ниже, могут быть приняты и адаптированы специалистом для удовлетворения определенным потребностям.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Пример 1.

Этот пример показывает влияние следующей композиции эксципиентов на внешний вид образцов композиции конъюгата MAb-DM1.

Образцы hu901-SPP-DM1 были приготовлены в виде раствора с концентрацией 1,0 мг/мл в 10 мМ фосфатном буфере, pH 6,5, с 140 мМ NaCl с каждым из эксципиентов, перечисленных ниже. Эксципиенты добавляли прямо к образцу huN901-SPP-DM1 на основе весовых процентов (вес эксципиента/вес раствора). Немедленно после добавления эксципиента композиции фильтровали, определяли их внешний вид и считали количество частиц. Затем образцы хранили при 4°C во время исследования и тестировали вновь через 2 недели и 1 месяц. Для определения внешнего вида образцы тестировали путем проверки по меньшей мере 1,0 мл раствора против белого фона на прозрачность и против черного фона под белым светом на присутствие и отсутствие видимых частиц. Результаты сообщаются как присутствие или отсутствие видимых частиц. Частицы меньше видимых с размером примерно 5 мкм были также измерены со счетчиком частиц H1AC, откалиброванным для измерения частиц размером между 2 и 100 мкм.

Внешний вид:

Эксципиент	Начальный	Через 2 недели	Через 1 месяц
5% сахароза	прозрачный	прозрачный	прозрачный
10% сахароза	прозрачный	прозрачный	прозрачный
0,1% Tween 20	прозрачный	прозрачный	прозрачный
0,8% Tween 20	прозрачный	частицы	прозрачный
1% циклодекстрин	прозрачный	прозрачный	прозрачный
1% декстроза	прозрачный	прозрачный	частицы
5% глицерин	прозрачный	прозрачный	частицы
2% PEG6000	прозрачный	прозрачный	частицы
5% маннитол	прозрачный	частицы	частицы
Фильтрованный	прозрачный	прозрачный	частицы
контроль*			

* быстро профильтрован перед началом измерения времени

Количество частиц (счет >5 мкм на 1 мл):

Экспонент	Совокупное число частиц		
	Начальное	Через 2 недели	Через 1 месяц
5% сахара	94	120	84
10% сахара	68	14	58
0,1% Tween 20	40	76	76
0,8% Tween 20	86	120	120
1% β -циклодекстрин	8	4	10
1% декстроза	388	608	502
5% глицерин	4	32	42
2% PEG	12	6	72
5% маннитол	46	144	70
Фильтрованный контроль	222	284	720

Наблюдаются положительные эффекты сахара, TWEEN-20™, β -циклодекстрина, декстрозы, глицерина, глицерина, маннитола и PEG.

Пример 2.

Этот пример показывает влияние аминокислот на стабильность конъюгата huN901-SPP-DM1 в отношении агрегации конъюгата.

Образцы huN901-SPP-DM1 были приготовлены в виде раствора с концентрацией 5 мг/мл в следующих буферах и хранились при 2-8 и 25°C в течение 12 месяцев. Содержание агрегатов конъюгата тестировали путем хроматографического анализа через 1, 3, 6 и 12 месяцев.

- (1) 10 мМ фосфат натрия, 140 мМ NaCl, pH 6,5
- (2) 10 мМ цитрат натрия, 135 мМ NaCl, 0,01% полисорбата 20, pH 5,5
- (3) 10 мМ цитрат натрия, 130 мМ гистидин, 0,01% полисорбата 20, pH 5,5
- (4) 10 мМ цитрат натрия, 110 мМ глицин, 80 мМ NaCl, 0,01% полисорбата 20, pH 5,5.

Композиция	T0	2-8°C				25°C			
		1 мес	3 мес	6 мес	12 мес	1 мес	3 мес	6 мес	12 мес
Композиция 1	5,3	6,7	8,1	8,6	8,9	8,7	10,2	10,4	11,8
Композиция 2	4,5	5,0	5,4	5,6	5,5	5,8	6,6	7,2	8,2
Композиция 3	4,1	4,1	4,2	4,1	3,8	4,5	4,7	5,0	6,1
Композиция 4	4,2	4,5	4,8	4,9	4,1	5,2	5,8	6,2	7,3

Пример 1 демонстрирует, что гистидин улучшает композицию в отношении предотвращения образования агрегатов конъюгата. Глицин также является благоприятным.

Пример 3.

Этот пример показывает влияние гистидина на стабильность huMy9-6-SPDB-DM4 в терминах появления агрегатов конъюгата.

Конъюгат huMy9-6-SPDB-DM4 был сформулирован в виде раствора с концентрацией 5 мг/мл в:

- (1) 10 мМ цитрат натрия, 135 мМ NaCl, pH 5,5
- (2) 150 мМ гистидин/гистидин хлорида, pH 5,5

Образцы инкубировали при 2-8°C и 25°C в течение 6 месяцев, после чего они были тестированы на конъюгаты агрегатов путем хроматографического анализа.

Композиция	T0	2-8°C, 6 мес	25°C, 6 мес
Композиция 1	3,5	4,0	8,2
Композиция 2	3,2	3,2	7,1

Данные демонстрируют благоприятный эффект гистидина в предотвращении образования агрегатов.

Пример 4.

Этот пример показывает влияние буферного агента, сахара и аминокислоты на стабильность конъюгата huC242-SPDB-DM4 в отношении агрегации конъюгата.

Образцы huC242-SPDB-DM4 при концентрации 5 мг/мл в:

- (1) 10 мМ цитрат натрия, 135 мМ NaCl, pH 5,5
- (2) 10 мМ цитрат натрия, 5% сахара, 130 мМ глицин, 0,1% полисорбат 80, pH 5,5
- (3) 10 мМ гистидин/гистидин хлорида, 5% сахара, 130 мМ глицина, pH 5,5.

Тестирование содержания мономера и агрегата было выполнено в момент времени 0 и через 3 месяца хранения при 2-8°C и при 25°C.

Композиция	Агрегат (%)		
	T0	2-8°C, 3 мес	25°C, 3 мес
Композиция 1	4,0	4,3	9,1
Композиция 2	3,2	3,7	5,9
Композиция 3	2,4	2,3	3,8

Данные показывают, что сахароза и глицин совместно в описанной выше комбинации улучшают композицию в отношении защиты против агрегации конъюгата. Наибольшее улучшение наблюдается, когда применяется комбинация сахарозы и глицина с гистицином.

Пример 5.

Этот пример показывает влияние различных комбинаций, включающих сахарозу с и без глицина, на содержание агрегата конъюгата huN901-SPP-DM1.

Образцы huN901-SPP-DM1 с концентрацией 5,0 мг/мл в каждом из следующих жидких композиций были тестированы на содержание мономера и агрегата.

- (1) 10 mM цитрате натрия, 135 mM NaCl, 0,01% полисорбат 20, pH 5,5
- (2) 10 mM цитрате натрия, 60 mM NaCl, 5% сахароза, pH 5,5
- (3) 10 mM цитрате натрия, 60 mM NaCl, 0,01% полисорбат 20, 5% сахароза, pH 5,5
- (4) 10 mM цитрате натрия, 140 mM NaCl, pH 5,5
- (5) 10 mM цитрате натрия, 0,25 M глицин, 0,01% полисорбат 20, 0,5% сахароза, pH 5,5

Образцы, хранившиеся при 25°C, были тестированы на содержание агрегата через 3, 6 и 12 месяцев.

Композиция	Агрегат (%)		
	3 мес	6 мес	12 мес
Композиция 1	6,7	7,3	8,2
Композиция 2	5,2	5,7	6,2
Композиция 3	5,6	5,4	6,5
Композиция 4	10,0	10,4	11,8
Композиция 5	4,4	4,7	4,4

Во всех случаях композиции, включающие сахарозу, имели меньшее содержание агрегатов, чем таковые без сахарозы. Композиции, включающие глицин (композиция 5), в этом примере имели наилучшую стабильность.

Пример 6.

Этот пример показывает влияние полисорбата 80 на формирование частиц, вызванное перемешиванием. Ожидалось, что это стрессовое состояние (перемешивание) минимизирует стрессы, с которыми сталкиваются при доставке и перемещении жидкого конъюгата, в противоположность стрессам, встречающимся при статическом хранении (которые адресованы к примеру 1).

Образцы huC242-SPDB-DM4 были приготовлены в концентрации 1 мг/мл в следующих буферах и помещены в стеклянный пузырек USP типа 1 (5 мл в 10 мл пузырек), которые были запечатаны пробкой Flurotec®. Пузырьки трясли в течение 48 ч при 100 об./мин при комнатной температуре, используя шейкер Lab-Line Orbital.

- (1) 10 mM цитрате натрия, 135 mM NaCl, pH 5,5
- (2) 10 mM гистицин, 5% сахароза, 130 mM глицин, pH 5,5
- (3) 10 mM гистицин, 5% сахароза, 130 mM глицин, 0,1% полисорбат 80, pH 5,5
- (4) 10 mM гистицин, 5% сахароза, 250 mM глицин, pH 5,5
- (5) 10 mM гистицин, 1% сахароза, 250 mM глицин, 0,1% полисорбат 80, pH 5,5
- (6) 10 mM гистицин, 280 mM глицин, pH 5,5
- (7) 10 mM гистицин, 280 mM глицин, 0,1% полисорбат 80, pH 5,5
- (8) 10 mM гистицин, 10% сахароза, pH 5,5
- (9) 10 mM гистицин, 10% сахароза, 0,1% полисорбат 80, pH 5,5

После встряхивания в течение 48 ч все пузырьки были проверены визуально. Те, что включали полисорбат 80 (композиции 3, 5, 7 и 9), оставались прозрачными, в то время как все те, что не содержали полисорбата 80 (1, 2, 4, 6 и 8), были мутными. Эти данные демонстрируют благоприятный эффект полисорбата 80 на уменьшение количества частиц, появление которых обусловлено перемешиванием, таким, которое может встретиться во время доставки и перемещения жидкого конъюгата.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция иммуноконъюгата, включающая:

(а) иммуноконъюгат, представляющий собой антитело, ковалентно связанное с одним или более цитотоксическим лекарственным средством, и

(б) один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, полисорбата 20, полисорбата 80, циклодекстрина, декстрозы, глицерина, полиэтиленгликоля, маннитола и аминокислоты, где композиция является буферным водным раствором, имеющим pH 4,5-7,6.

2. Композиция по п.1, где композиция включает один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из:

- (i) 0,1-12% сахарозы,
- (ii) 0,005-1,0% полисорбата 20,
- (iii) 0,5-2% β -циклодекстрина,
- (iv) 2-8% глицерина,
- (v) 1-5% PEG6000,
- (vi) 2-8% маннитола,
- (vii) 0,005-1,0% полисорбата 80,
- (viii) 5-20 мМ гистидина и
- (ix) 100-300 мМ глицина.

3. Композиция по п.2, где композиция включает один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из:

- (i) 5-10% сахарозы,
- (ii) 0,005-0,2% полисорбата 20,
- (iii) 0,5-1% β -циклодекстрина,
- (iv) 2-5% глицерина,
- (v) 2-3% PEG6000,
- (vi) 3-5% маннитола,
- (vii) 0,005-0,2% полисорбата 80,
- (viii) 10-15 мМ гистидина и
- (ix) 130-250 мМ глицина.

4. Композиция по п.1, где буферный водный раствор включает один или более из гистидина, сукцината, цитрата, фосфата и ацетата.

5. Композиция по п.4, где значение pH составляет 5,0-7,0.

6. Композиция по п.5, где значение pH составляет 5,0-6,0.

7. Композиция по п.1, где иммуноконъюгат включает гуманизированное антитело, выбранное из группы, состоящей из huMy9-6, huC242, huN901, DS6, трастузумаба, биватузумаба, сибротузумаба и ритуксимаба.

8. Композиция по п.1, где иммуноконъюгат включает цитотоксическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из мейтанзиноида, таксана и CC-1065.

9. Жидкая композиция иммуноконъюгата, включающая:

(а) иммуноконъюгат, представляющий собой антитело, ковалентно связанное с одним или более цитотоксическим лекарственным средством, и

(б) один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из гистидина, сахарозы и глицина,

где композиция представляет собой буферный раствор, имеющий pH 4,5-7,6.

10. Композиция по п.9, где композиция включает один или более эксципиентов, выбранных из 5-200 мМ гистидина, 100-200 мМ глицина и 2-8% сахарозы.

11. Композиция по п.10, где эксципиент представляет собой 5-100 мМ гистидина или 100-150 мМ глицина.

12. Композиция по п.9, где композиция включает 2-8% сахарозы и 100-150 мМ глицина.

13. Композиция по п.12, где композиция включает 10 мМ гистидина, 5% сахарозы и 130 мМ глицина.

14. Композиция по п.9, где водный буферный раствор включает один или более из гистидина, сукцината, цитрата, фосфата и ацетата.

15. Композиция по п.14, где значение pH составляет 5,0-7,0.

16. Композиция по п.15, где значение pH составляет 5,0-6,0.

17. Композиция по п.9, дополнительно включающая полисорбат 20 и/или полисорбат 80.

18. Композиция по п.9, где иммуноконъюгат включает гуманизированное антитело, выбранное из группы, состоящей из huMy9-6, huC242, huN901, DS6, трастузумаба, биватузумаба, сибротузумаба и ритуксимаба.

19. Композиция по п.9, где иммуноконъюгат включает цитотоксическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из мейтанзиноида, таксана и CC-1065.

20. Композиция иммуноконъюгата, включающая:

(а) иммуноконъюгат huN901-DM1 в концентрации 0,5-10 мг/мл;

(b) 5-15 мМ гистидина и/или 5-15 мМ сукцината;

(c) 0,1-10% сахарозы и/или 100-300 мМ глицина;

(d) 0,005-0,2% полисорбата 80 и/или 0,005-0,2% полисорбата 20,

где композиция является водным буферным раствором, имеющим pH 5-6 и DM1 представляет собой N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)мейтанзин.

21. Композиция иммуноконъюгата, включающая:

- (a) иммуноконъюгат huC242-DM4 в концентрации 0,5-10 мг/мл;
 - (b) 5-15 мМ гистидина;
 - (c) 0,1-10% сахарозы и/или 100-300 мМ глицина;
 - (d) 0,005-0,2% полисорбата 80 и/или 0,005-0,2% полисорбата 20,
- где композиция является водным буферным раствором, имеющим рН 5-6 и DM4 представляет собой N-2'-деацетил-N-2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопропил)мейтанзин.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
