

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202190382 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.05.17

(51) Int. Cl. A61K 47/26 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.07.30

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ МАСКИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ

(31) 62/712,906

(72) Изобретатель:

(32) 2018.07.31

Трухейт Майкл Джон,

(33) US

Гхаттивенкатакришна Паван,

(86) PCT/US2019/044197

Джаганнатан Бхарадвадж (US)

(87) WO 2020/028401 2020.02.06

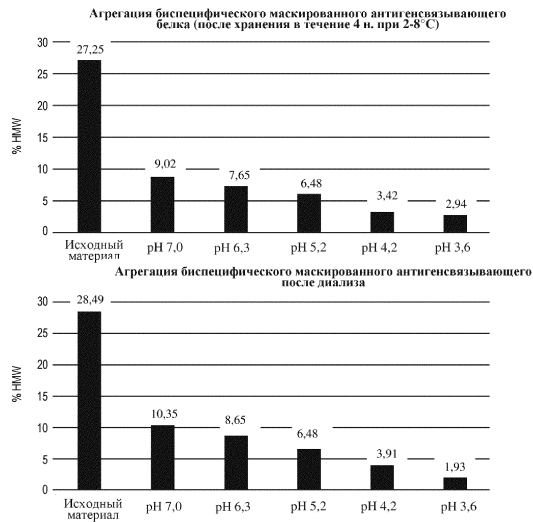
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(57) Данное изобретение направлено на фармацевтические композиции и/или составы с низким pH, содержащие маскированный антигенсвязывающий белок.



202190382

A1

A1

202190382

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566577EA/011

### ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ МАСКИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ

Перекрестная ссылка на родственную заявку

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/712906, поданной 31 июля 2018 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Область техники изобретения

[0002] Данное изобретение направлено на фармацевтические композиции и/или составы с низким рН, содержащие маскированный антигенсвязывающий белок.

Перекрестная ссылка на материал, включенная посредством ссылки

[0003] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки в его полном объеме, подается одновременно с данной заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) под названием "52811\_Seqlisting.txt", размером 12007 байт; созданный 30 июля 2018 года.

Уровень техники

[0004] Фармацевтические препараты на основе белков относятся к наиболее быстро развивающимся терапевтическим средствам в (до)клинической разработке и в качестве коммерческих продуктов. По сравнению с лекарственными средствами на основе небольших молекул белковые фармацевтические препараты обладают высокой специфичностью и активностью при относительно низких концентрациях и, как правило, предназначены для терапии заболеваний, значительно снижающих качество жизни, таких как различные формы рака, аутоиммунные заболевания и нарушения обмена веществ (Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul; 32(7):372-80, Wang, Int J Pharm. 1999 Aug 20; 185(2):129-88).

[0005] В настоящее время фармацевтические препараты на основе белков, таких как рекомбинантные белки и антитела, могут быть получены с высокой степенью чистоты при их изготовлении благодаря достижениям в способах очистки в промышленном масштабе. Однако рекомбинантные белки, включая антитела, обладают низкой стабильностью и сильно подвержены как химическому, так и физическому разложению. Химическое разложение относится к модификациям, включающим ковалентные связи, такие как дезамидирование, окисление, расщепление или образование новых дисульфидных связей, гидролиз, изомеризацию или дегликозилирование. Физическое разложение включает развертывание белка, нежелательное поглощение на поверхностях и агрегацию. Решение проблем, обусловленных такой физической и химической нестабильностью, является одной из наиболее сложных задач при разработке фармацевтических препаратов на основе белков (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, №. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul; 32(7):372-80).

[0006] Агрегация белков является основным событием физической нестабильности белков и антител и в общем происходит из-за присущей им тенденции к минимизации термодинамически неблагоприятного взаимодействия между растворителем и остатками гидрофобного белка. Это особенно проблематично, поскольку обычно встречается во время процессов получения, рефолдинга, очистки, стерилизации, доставки и хранения. Агрегация может возникать даже при таких условиях раствора, когда нативное состояние белка или антитела является весьма термодинамически благоприятным (например, нейтральный показатель pH и 37°C) и в отсутствие стрессов (Chi et al., *Pharm Res*, Vol. 20, №. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, *Trends Biotechnol.* 2014 Jul; 32(7):372-80, Wang, *Int J Pharm.* 1999 Aug 20; 185(2):129-88, Mahler *J Pharm Sci.* 2009 Sep; 98(9):2909-34).

[0007] Агрегация антител является проблемой, поскольку она может нарушать биологическую активность. Более того, агрегация антител приводит к нежелательным органолептическим свойствам лекарственного продукта и снижает выход продукта из-за сложных стадий очистки, которые необходимы для удаления агрегатов из конечного продукта. За последнее время также растущее значение агрегированных антител (даже гуманизированных или полностью человеческих антител) может значительно увеличить риск развития у пациента иммунного ответа на активный мономер антитела/белка, что приводит к образованию нейтрализующих антител и лекарственной устойчивости или другим неблагоприятным побочным эффектам (Mahler *J Pharm Sci.* 2009 Sep; 98(9):2909-34).

[0008] В целом, сообщалось о нескольких попытках минимизировать агрегацию белков с помощью различных механизмов. Белки, включая антитела, могут также быть стабилизированы и таким образом защищены от образования агрегатов и других химических изменений путем модификации их первичной структуры, за счет чего увеличивается внутренняя гидрофобность и уменьшается внешняя гидрофобность. Однако изменение белков или антител посредством генной инженерии может приводить в результате к нарушенной функциональности и/или к повышенной иммуногенности. Другой подход сфокусирован на диссоциации агрегатов (называемых "деагрегация") для восстановления функциональных нативных мономеров с использованием различных механизмов, таких как температура, давление, pH и соли. В настоящее время белковые агрегаты и агрегаты антител удаляются в виде примесей в основном на стадиях заключительной очистки с помощью последовательности способов обработки. Однако в случаях высоких уровней высокомолекулярных (HMW) форм антител удаление значительного количества HMW не только приводит в результате к существенной потере выхода, но также усложняет разработку надежного последующего способа (Chi et al., *Pharm Res*, Vol. 20, №. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336).

[0009] Сохранение стабильности и активности белка при биологических и биотехнологических видах применения создает серьезные проблемы. В данной области техники существует потребность в оптимизированных фармацевтических композициях, которые обеспечивают улучшенную стабилизацию антител или терапевтических белков и

уменьшают агрегацию и денатурацию или разложение в ходе составления, заполнения, доставки, хранения и введения, за счет чего предотвращаются потеря функции и неблагоприятные иммуногенные реакции.

#### Краткое описание

[0010] Данное изобретение предусматривает фармацевтические композиции и/или составы, применимые для минимизации или снижения агрегации и/или количества высокомолекулярных форм маскированных антигенсвязывающих белков. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предусматривает фармацевтическую композицию или состав, содержащие: (A) маскированный антигенсвязывающий белок (включающий, например, пролекарство на основе Probody или ProTIA), содержащий (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которые связываются с антигеном; и (ii) маскирующий домен (MD1), соединенный с AB1, где маскирующий домен содержит (a) маскирующий пептид или маскирующий полипептид (MP1), которые ингибируют или снижают активность связывания AB1 с антигеном; и (b) сайт распознавания белка (PR1), где связывание с PR1 или его расщепление белком или протеазой повышает активность связывания AB1 с антигеном; (B) по меньшей мере одно буферное средство и (C) по меньшей мере один полиол, где pH фармацевтической композиции или состава ниже изоэлектрической точки (pI) AB1- и MD1-областей маскированного антигенсвязывающего белка.

[0011] В некоторых других вариантах осуществления данное изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию или состав, содержащие: (A) маскированный антигенсвязывающий белок (включающий, например, пролекарство на основе Probody или ProTIA), содержащий (i) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которые связываются с антигеном; и (ii) первый маскирующий домен (MD1), соединенный с AB1, где маскирующий домен содержит (a) маскирующий пептид или маскирующий полипептид (MP1), которые ингибируют или снижают активность связывания AB1 с антигеном; и (b) сайт распознавания белка (PR1), где связывание с PR1 или его расщепление белком или протеазой повышает активность связывания AB1 с антигеном; (iii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которые связываются со вторым антигеном; и (vi) второй маскирующий домен (MD2), соединенный с AB2, где второй маскирующий домен содержит (a) маскирующий пептид или маскирующий полипептид (MP2), которые ингибируют или снижают активность связывания AB2 с антигеном; и (b) второй сайт распознавания белка (PR2), где связывание с PR2 или его расщепление белком или протеазой повышает активность связывания AB2 со вторым антигеном, (B) по меньшей мере одно буферное средство и (C) по меньшей мере один полиол, где pH фармацевтической композиции или состава ниже изоэлектрических точек (pI) AB1-, AB2-, MD1- и MD2-областей маскированного антигенсвязывающего белка.

[0012] В некоторых аспектах AB1- и/или AB2-области маскированного антигенсвязывающего белка (включая, например, пролекарство на основе Probody или ProTIA), представляют собой scFv или Fab и/или связывают антиген, экспрессируемый на

поверхности клетки (включая, например, CD3).

[0013] Фармацевтические композиции или составы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно буферное средство. В некоторых вариантах осуществления буферное средство выбрано из группы, состоящей из ацетата, глутамата, цитрата, сукцината, тартрата, fumarата, малеата, гистидина, фосфата и 2-(N-морфолино)этансульфоната или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно буферное средство присутствует в композиции или составе в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ (например, от 5 мМ до 200 мМ) или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ (например, от 10 мМ до 50 мМ).

[0014] Фармацевтические композиции или составы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один полиол. В некоторых вариантах осуществления полиол представляет собой сахарид. В некоторых вариантах осуществления сахарид выбран из группы, состоящей из моносахарида, дисахарида, циклического полисахарида, сахарного спирта, линейного разветвленного декстрана и линейного неразветвленного декстрана или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления полиол представляет собой сахарный спирт (например сорбит). В некоторых вариантах осуществления полиол представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, ксилит, эритрит, изомальт, глицерин, циклодекстрин или каптисол. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол присутствует в композиции или составе в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20% (вес/об.) (или от приблизительно 9 до приблизительно 12% (вес/об.)).

[0015] В некоторых случаях фармацевтические композиции или составы по настоящему изобретению могут необязательно дополнительно содержать по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80, полуксамера 188, плюроники F68, тритона X-100, полиоксиэтилена3 и PEG 3350, PEG 4000, PEG 8000 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, находящейся в диапазоне от 0,004 до приблизительно 0,5% (вес/об.) (или от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01% (вес/об.)).

[0016] В некоторых вариантах осуществления pH композиции или состава составляет более чем 3,5, и/или pH на приблизительно 2 единицы pH ниже, чем pI АВ1-, АВ2-, MD1- и/или MD2-области(-ей) (дополнительно описанных ниже) маскированного антигенсвязывающего белка (включая, например, пролекарство на основе Probody или ProTIA). В некоторых вариантах осуществления pH композиции или состава составляет от 7,0 до 3,6. В некоторых вариантах осуществления pH композиции или состава находится в диапазоне от приблизительно 3,5 до приблизительно 5,5 или находится в диапазоне от 4,0 до 5,0. В некоторых вариантах осуществления pH композиции или состава составляет

приблизительно 4,2 или приблизительно 3,6. В некоторых вариантах осуществления pH композиции или состава составляет 4,2 или 3,6.

[0017] Фармацевтические композиции или составы по настоящему изобретению могут необязательно дополнительно содержать вспомогательное вещество на основе аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество на основе аминокислоты присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 20% (мМ).

[0018] Фармацевтическая композиция или составы по настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления содержат 10 мМ глутамата, 9% (вес/об.) сахарозы и 0,01% (вес/об.) полисорбата 80, и где pH раствора фармацевтической композиции составляет 4,2 или 3,6. В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок присутствует в композиции в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 17 мг/мл или от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок присутствует в композиции в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 50 мкг до приблизительно 200 мг.

[0019] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут представлять собой лиофилизированную композицию или жидкую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой восстановленную лиофилизированную композицию.

[0020] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию, которая является стабильной после хранения при 2-8°C, 4°C и/или 25°C в течение 0, 1, 2 и/или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция или состав характеризуются сниженной агрегацией антител и/или сниженными уровнями высокомолекулярных форм антител, как измерено с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC) в приблизительно 1 раз, приблизительно 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 6 раз, приблизительно 7 раз, приблизительно 8 раз, приблизительно 9 раз или приблизительно 10 раз по сравнению с эталонной фармацевтической композицией, состоящей из 1 мг/мл маскированного антигенсвязывающего белка, 100 мМ глицина при pH 4,9.

[0021] В другом аспекте в данном документе описан способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту композиции или состава по настоящему изобретению.

[0022] Термины "содержащий," "имеющий," "включающий," и "состоящий" следует понимать, как открытые термины (т. е. означающие "включающий без ограничения" и допускающий наличие одной или нескольких характеристик или компонентов), если не указано иное. Следует понимать, что хотя различные варианты осуществления в данном описании представлены с использованием формулировки "содержащий", при различных обстоятельствах связанный вариант осуществления также может быть описан с

использованием формулировок "состоящий из" или "состоящий фактически из". Следует отметить, что термин в единственном числе обозначает один или несколько, например, термин "молекула иммуноглобулина" следует понимать, как одну или несколько молекул иммуноглобулина, если контекст не определяет обратное. Как таковые, термины в единственном числе "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Кроме того термин "и/или", используемый в данном документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждой из двух указанных функций или компонентов с другим или без другого. Таким образом термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А и/или В" в данном документе предполагает включение "А и В," "А или В," "А" (только) и "В" (только). Подобным образом термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А, В и/или С" предусматривает охват каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только) и С (только).

[0023] Также следует понимать, что при описании диапазона значений описываемая характеристика может являться отдельным значением, которое находится в пределах диапазона. Например, "рН от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 6," могло бы составлять без ограничения рН 4, 4,2, 4,6, 5,1, 5,5 и т. д. и любое значение между такими значениями. Дополнительно, выражение "рН от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 6" не следует толковать как означающий то, что рН рассматриваемого состава варьируется на 2 единицы рН в диапазоне от рН 4 до рН 6 во время хранения, а скорее значение может быть выбрано в этом диапазоне для рН раствора, и при этом рН остается буферизированным при приблизительно данном значении рН. В некоторых вариантах осуществления, в случае если используется термин "приблизительно", он означает указанное число плюс или минус 10% от указанного числа.

[0024] В любом из диапазонов, описанных в данном документе, граничные значения диапазона включены в диапазон. Однако описание также предполагает те же диапазоны, в которых исключены более низкие и/или более высокие граничные значения. Дополнительные характеристики и вариации настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области из всего объема данной заявки, включающей фигуры и подробное описание, и все такие характеристики предполагаются как аспекты настоящего изобретения. Подобным образом характеристики настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно повторно объединять в дополнительные варианты осуществления, которые также предполагаются как аспекты настоящего изобретения, без соответствия тому, являются ли они комбинацией характеристик, конкретно указанных выше как аспект или вариант осуществления настоящего изобретения. Кроме того, только такие ограничения, которые описанные в данном документе как критичные для настоящего изобретения следует рассматривать как таковые; варианты настоящего изобретения, лишенные ограничений, которые не были описаны в данном документе как критические, рассматриваются как аспекты настоящего изобретения.

[0025] Если не указано иное, то все используемые в данном документе технические

и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом средней квалификации в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press предоставляют специалисту в данной области общий словарь многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

[0026] Единицы измерения, префиксы и символы указываются в их форме, принятой *Système International de Unites (SI)*. Числовые диапазоны включают числа, обозначающие эти диапазоны. Если не указано иное, то все аминокислотные последовательности пишутся слева направо в направлении от amino до карбокси. Заголовки, предусмотренные в данном документе, не являются ограничениями разнообразных аспектов или аспектов настоящего изобретения, которое может быть получено посредством ссылки на описание в целом.

[0027] Все ссылки, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в его полном объеме.

Краткое описание графических материалов

[0028] **Фигуры 1A-1D** представляют собой столбиковые диаграммы, представляющие результаты анализа с использованием эксклюзионной ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), демонстрирующие % главного пика (левая панель) и % высокомолекулярных форм (правая панель) биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе В, при хранении либо при 2-8°C, либо при 25°C в течение 0, 2 недель и 4 недель.

[0029] **Фигуры 2A-2D** представляют собой столбиковые диаграммы, представляющие результаты SE-UHPLC-анализа, демонстрирующие % главного пика (левая панель) и % высокомолекулярных форм (правая панель) биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе С, при хранении либо при 2-8°C, либо при 25°C в течение 0, 1 недели, 2 недель и 4 недель.

[0030] **Фигуры 3A-3D** представляют собой столбиковые диаграммы, представляющие результаты SE-UHPLC-анализа, демонстрирующие % главного пика (левая панель) и % высокомолекулярных форм (правая панель) биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе D, при хранении либо при 2-8°C, либо при 25°C в течение 0, 2 недель и 4 недель.

[0031] **Фигуры 4A-4D** представляют собой столбиковые диаграммы, представляющие результаты SE-UHPLC-анализа, демонстрирующие % главного пика (левая панель) и % высокомолекулярных форм (правая панель) биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе E, при хранении либо при 2-8°C, либо при 25°C в течение 0, 2 недель и 4 недель.

[0032] **Фигуры 5A-5D** представляют собой столбиковые диаграммы, представляющие результаты SE-UHPLC-анализа, демонстрирующие % главного пика (левая панель) и % высокомолекулярных форм (правая панель) биспецифического



маскированного антигенсвязывающего белка в составе F, при хранении либо при 2-8°C, либо при 25°C в течение 0, 2 недель и 4 недель.

[0033] **Фигуры 6А и 6В** представляют собой столбиковые диаграммы, представляющие результаты SE-UHPLC-анализа, демонстрирующие % высокомолекулярных форм биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе А ("исходный материал"), составе F ("рН 7,0"), составе E ("рН 6,3"), составе D ("рН 5,2"), составе С ("рН 4,2") или составе В ("рН 3,6") при хранении либо при 2-8°C в течение 0 (нижние панели) и 4 недель (верхние панели).

[0034] **Фигуры 7А и 7В** представляют собой графики, демонстрирующие уменьшение в уровне агрегации после диализа в состав с низким рН (состав С) по сравнению с исходным материалом (состав А).

[0035] **Фигуры 8А и В** представляют собой графики, демонстрирующие стабильность биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка (1 мг/мл) в составе с низким рН (состав С) при хранении либо при 4°C? либо при 25°C в течение 0, 1 недели или двух недель, как определено с помощью эксклюзионного анализа. На фигуре 8А хроматограммы смещены.

[0036] **Фигуры 9А и В** представляют собой столбиковые диаграммы, демонстрирующие стабильность биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе с низким рН при высоких концентрациях (например, 17 мг/мл), как определено с помощью эксклюзионного (SEC) анализа. Состав С при концентрации белка 17 мг/мл характеризовался значительно более низким уровнем агрегации / % высокомолекулярных форм по сравнению с составом А ("исходный материал") при концентрации белка 11 мг/мл (левая панель). Состав С при концентрации белка 17 мг/мл также был стабильным после 0, двух или четырех недель хранения при 4°C (правая панель).

[0037] **Фигуры 10А-10D** представляют собой столбиковые диаграммы, представляющие результаты анализа с использованием эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), демонстрирующие % главного пика (левая панель) и % высокомолекулярных форм (правая панель) маскированного биспецифического антитела в составе А, при хранении либо при 2-8°C, либо при 25°C в течение 0, 2 недель и 4 недель.

[0038] **Фигура 11** представляет собой изображение иллюстративного маскированного антигенсвязывающего белка, также известного как "Probody".

[0039] **Фигура 12** представляет собой изображение иллюстративного маскированного антигенсвязывающего белка, также известного как "пролекарство ProTIA". "ЕСВМ" представляет собой антигенсвязывающий домен (т. е. антигенсвязывающий домен (АВ1)); "ТАВМ" представляет собой второй антигенсвязывающий домен (т. е. второй антигенсвязывающий домен (АВ2)); "RS" представляет собой пептид или полипептидную последовательность, которые можно расщеплять протеазой (т. е. домен распознавания белка (PR)); "объединяющий фрагмент" представляет собой пептид или полипептид,

которые ингибируют или снижают способность ЕСМВ и/или ТАВМ к связыванию с антигеном (например, маскирующий домен (MD)). Как только ProTIA в его проформе расщепляется в сайте RS, связывание ЕСМВ и/или ТАВМ с антигеном улучшается.

#### Подробное описание

[0040] Конкретные фармацевтические препараты на основе белков, включающие антитела, в общем являются нестабильными в жидких составах в течение длительного периода времени и особенно нестабильными при повышенных температурах, например 25°C и выше. Настоящее изобретение описывает составы с низким рН, содержащие маскированный антигенсвязывающий белок, который связывает один, два или больше антигенов. В некоторых вариантах осуществления биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок специфически связывает CD3 (включая, например, эpsilon-цепь CD3) и антиген клеточной поверхности (включая, например, EGFR) таким образом, чтобы временно приводить злокачественные клетки в пространственную близость с активированными Т-клетками, вызывая тем самым опосредованное Т-клетками уничтожение злокачественных клеток, связанных с антителами.

[0041] Общая концепция, лежащая в основе настоящего изобретения, является открытием того, что коллоидная стабильность жидкой фармацевтической композиции, содержащей маскированный антигенсвязывающий белок (включая, например, биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки) значительно улучшается при рН, которое как (1) ниже, чем изоэлектрическая точка (pI) антитела или антигенсвязывающего домена маскированного антигенсвязывающего белка (например, VH/VL-области или их антигенсвязывающие фрагменты или AB1- и/или AB2-области, как описано ниже), так и (2) ниже, чем pI маскирующих доменов (MD1- и MD2-области, описанные дополнительно ниже) маскированного антигенсвязывающего белка. Тяжелая и легкая цепи маскированного антигенсвязывающего белка, как правило, характеризуются разными изоэлектрическими точками (pI), при этом полная тяжелая цепь обычно характеризуется более высоким pI, чем полная легкая цепь. Значение pI маскированного антигенсвязывающего белка (включая, например, биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки) и/или области или домены внутри маскированного антигенсвязывающего белка можно определять любым из множества способов (включая, например, с использованием алгоритма Bjellqvist, как описано в Perez-Riverol, Y. et al. Isoelectric point optimization using peptide descriptors and support vector machines. *Journal of proteomics* 75, 2269-2274 (2012), включенном в данный документ посредством ссылки). См. также, Kozlowski LP. IPC - Isoelectric Point Calculator. *Biology Direct*. 2016; 11:55, включенный в данный документ посредством ссылки, описывающий подробности калькулятора изоэлектрической точки (IPC), доступного онлайн по адресу <http://isoelectric.ovh.org>.

[0042] Значение pI области маскированного антигенсвязывающего белка (MD1- и/или MD2-области, как далее описано ниже) часто отличается от pI антигенсвязывающих

частей маскированного антигенсвязывающего белка (включая, например, тяжелую/легкую цепь или их антигенсвязывающий участок, или АВ1- и/или АВ2-области, как описано ниже).

[0043] Значение рI других иллюстративных теоретических АВ- и MD-областей теоретических маскированных антигенсвязывающих белков представлены в таблице 1. Рекомендуемое рН для снижения агрегации и улучшения стабильности для этих иллюстративных теоретических маскированных антигенсвязывающих белков, биспецифических маскированных антигенсвязывающих белков и полиспецифических маскированных антигенсвязывающих белков также представлено в таблице 1.

**ТАБЛИЦА 1.**

<b>Антитело</b>	<b>АВ1 рI</b>	<b>АВ2 рI</b>	<b>АВ3 рI</b>	<b>MD1 рI</b>	<b>MD2 рI</b>	<b>MD 3 рI</b>	<b>рН</b>
Маскированный антигенсвязывающий белок 1	8,24	--	--	5,7	--	--	Менее чем 5,7 или 3,5-5,7
Маскированный антигенсвязывающий белок 2	6,57	--	--	6,63	--	--	Менее чем 6,57 или 3,5-6,57
<i>Биспецифический</i> маскированный антигенсвязывающий белок 1	8,34	6,29	--	5,5	6,74	--	Менее чем 5,5 или 3,5-5,5
<i>Биспецифический</i> маскированный антигенсвязывающий белок 2	8,24	6,28		4,74	6,53		Менее чем 4,74 или 3,5-4,74
<i>Полиспецифический</i> маскированный антигенсвязывающий белок 1	8,34	6,29	6,84	5,5	6,75	4,3	Менее чем 4,3 или 3,5-4,3
<i>Полиспецифический</i> маскированный антигенсвязывающий белок 2	8,52	6,54	7,22	6,61	6,52	6,8	Менее чем 6,52 или 3,5-6,52

[0044] Соответственно, в данном документе авторы настоящего изобретения описывают фармацевтические композиции, где рН композиции маскированного

антигенсвязывающего белка (1) ниже, чем изоэлектрическая точка (pI) антитела или антигенсвязывающего домена маскированного антигенсвязывающего белка (например, VH/VL-области или их антигенсвязывающие фрагменты или АВ1- и/или АВ2-области, как дополнительно описано ниже) и/или (2) ниже, чем pI маскирующего домена (MD1- и MD2-области, как дополнительно описано ниже) маскированного антигенсвязывающего белка. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, низкий pH фармацевтической композиции обеспечивает то, что подобласти (включающие, например, антигенсвязывающую область и маскирующие области или АВ1- и/или АВ2-области, как дополнительно описано ниже) маскированного антигенсвязывающего белка имеют общий положительный заряд, который приводит в результате как к между-, так и к внутримолекулярному отталкиванию, которое снижает агрегацию антител и повышает стабильность. В случаях когда домен (например маскирующий домен) имеет кислотный pI, а другой домен (например антитело или антигенсвязывающий домен) имеет основной pI могут образовываться диполи в результате, если pH фармацевтической композиции составляет значение между pI обоих доменов (например, при pH 7), что приводит к внутри- и межмолекулярным электростатическим притяжениям, которые повышают уровень агрегации антител и снижают стабильность. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, электростатические притяжения похоже приводят к агрегации и, таким образом, к образованию нежелательных высокомолекулярных (НМВ) форм. НМВ-формы существенно влияют на стабильность раствора или коллоидную стабильность дисперсии. Это является особой проблемой в случае маскированных антигенсвязывающих белков (включая биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки), которые могут содержать многие антигенсвязывающие домены и/или многие маскирующие полипептиды, где каждый маскирующий полипептид локально взаимодействует с окружающими аминокислотами, что приводит в результате к дополнительным затруднениям. Низкий pH композиции по настоящему изобретению делает возможным протонирование различных доменов и электростатическое отталкивание, приводя тем самым к неожиданно пониженной частоте возникновения НМВ-форм маскированных антигенсвязывающих белков (включая, например, биспецифические или полиспецифические антигенсвязывающие белки). В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции находится в диапазоне от 3,5 до 5,5. Предпочтительным является значение pH от 4,0 до 5,5, такое как значение pH от 4,2 до 4,8. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным значением pH является значение pH от 3,6 до 4,2. В некоторых вариантах осуществления pH композиции на приблизительно 2 единицы pH ниже, чем pI АВ1-, АВ2-, MD1- и/или MD2-области(-ей) маскированного антигенсвязывающего белка (дополнительно описано ниже). В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 3,6. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет более чем приблизительно 3,5.

[0045] Различные аспекты состава описаны ниже. Заголовки разделов используются

только для удобства чтения и не предназначены для ограничения per se. Весь документ предназначен для рассмотрения в качестве единого раскрытия, и следует понимать, что предусмотрены все комбинации описанных в данном документе признаков.

### *Буферы*

[0046] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит буфер, который необязательно может быть выбран из группы, состоящей из ацетата, глутамата, цитрата, сукцината, тартрата, фумарата, малеата, гистидина, фосфата, 2-(N-морфолино)этансульфоната, фосфата калия, солей калия, двухвалентного катиона, кальция, магния, марганца, цинка, уксусной кислоты/ацетата натрия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты/сукцината натрия, винной кислоты/тартрата натрия, гистидина/гистидин-HCl, глицина, Tris, глутамата, аминокислоты, лизина, аргинина, пролина и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из ацетата, глутамата, цитрата, сукцината, тартрата, фумарата, малеата, гистидина, фосфата, 2-(N-морфолино)этансульфоната и их комбинаций.

[0047] Буферные средства часто используются для контроля pH в составе. В некоторых вариантах осуществления буфер добавляют в концентрации, которая поддерживает pH состава на уровне от приблизительно 3,5 до приблизительно 5, или от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,5, или от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,0, или от приблизительно 4,2 до приблизительно 4,8, или 4,2, или 3,6, или более чем 3,5. Эффект pH в отношении составов можно охарактеризовать с использованием любого одного или нескольких из некоторого количества подходов, таких как ускоренные исследования стабильности.

[0048] Органические кислоты, фосфаты и Tris являются подходящими буферами для белковых составов (таблица 2). Буферная емкость буферных соединений является максимальной при pH, равном pKa, и уменьшается по мере увеличения или уменьшения pH относительно этого значения. Девяносто процентов буферной емкости находится в пределах одной единицы pH от их pKa. Буферная емкость также увеличивается пропорционально увеличению концентрации буфера.

[0049] Как правило, при выборе буфера принимают во внимание несколько факторов. Например, буферные соединения и их концентрацию нужно определять на основе их pKa и требуемого pH состава. Также важно удостовериться, что буфер совместим с лекарственным средством на основе белка, другими вспомогательными веществами состава и не катализирует какие-либо реакции разложения. Недавно было показано, что полианионные карбоксилатные буферы, такие как цитрат и сукцинат, образуют ковалентные аддукты с остатками боковых цепей белков. Третий аспект, который следует принимать во внимание, представляет собой ощущение жжения и раздражения, которое может вызывать буфер.

ТАБЛИЦА 2. Широко используемые буферные средства и их значения pKa

Буфер	pK <sub>a</sub>	Иллюстративный лекарственный продукт
Ацетат	4,8	Neupogen, Neulasta
Сукцинат	pK <sub>a1</sub> =4,8, pK <sub>a2</sub> =5,5	Actimmune
Цитрат	pK <sub>a1</sub> =3,1, pK <sub>a2</sub> =4,8, pK <sub>a3</sub> =6,4	Humira
Гистидин (имидазол)	6,0	Xolair
Фосфат	pK <sub>a1</sub> =2,15, pK <sub>a2</sub> =7,2, pK <sub>a3</sub> =12,3	Enbrel (жидкий состав)
Tris	8,1	Leukine

[0050] Буферную систему, присутствующую в составе, выбирают для обеспечения физиологической совместимости и для поддержания требуемого pH.

[0051] Буфер может присутствовать в любом количестве, подходящем для поддержания pH состава на заранее заданном уровне. Буфер может присутствовать в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 1000 мМ (1 М), или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ. Подходящие концентрации буфера охватывают концентрации, составляющие приблизительно 200 мМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления буфер в составе присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 190 мМ, приблизительно 180 мМ, приблизительно 170 мМ, приблизительно 160 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 140 мМ, приблизительно 130 мМ, приблизительно 120 мМ, приблизительно 110 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 10 мМ или приблизительно 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700 или 900 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет от приблизительно 1, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 мМ до 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет от приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 или 40 мМ до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет приблизительно 10 мМ.

[0052] Другие иллюстративные pH-буферные средства, используемые для буферизации состава, как указано в данном документе, включают без ограничения глицин, глутамат, сукцинат, фосфат, ацетат и аспарат. В качестве буферных средств также можно

использовать аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, пролин и глутаминовая кислота.

### *Полиолы*

[0053] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, также содержат по меньшей мере один полиол. Полиолы охватывают класс вспомогательных веществ, который включает сахара (например маннит, сахарозу, сорбит) и другие многоатомные спирты (например глицерин и пропиленгликоль). в эту категорию включен полимер полиэтиленгликоль (PEG). Полиолы обычно используют в качестве стабилизирующих вспомогательных веществ и/или изотонических средств как в жидких, так и в лиофилизированных белковых составах для парентерального введения. Полиолы могут защищать белки как от физических, так и от химических путей разложения.

[0054] Иллюстративные полиолы, подходящие для фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, включают без ограничения сахарозу, трегалозу, маннозу, мальтозу, лактозу, глюкозу, рафинозу, целлобиозу, гентиобиозу, изомальтозу, арабинозу, глюкозамин, фруктозу, маннит, сорбит, глицин, аргинин-HCL, полигидрокси-соединения (включая, например, полисахариды, такие как декстран, крахмал, гидроксиэтилкрахмал, циклодекстрины, каптизол, N-метилпироллиден, целлюлоза и гиалуроновая кислота) и хлорид натрия (Carpenter et al., Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)).

[0055] Дополнительные полиолы, подходящие для фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, включают без ограничения пропиленгликоль, глицерин (глицерол), треозу, треит, эритрозу, эритрит, рибозу, арабинозу, арабит, ликсозу, мальтит, сорбит, сорбозу, глюкозу, маннозу, маннит, левулозу, декстрозу, мальтозу, трегалозу, фруктозу, ксилит, инозит, галактозу, ксилозу, фруктозу, сахарозу, 1,2,6-гексантиол и т. п. Сахара высшего порядка включают декстран, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Восстанавливающие сахара, такие как фруктоза, мальтоза или галактоза, окисляются быстрее, чем невосстанавливающие сахара. Дополнительными примерами сахарных спиртов являются глюцит, мальтит, лактит или изомальтулоза. Примеры восстанавливающих сахаров включают глюкозу, мальтозу, лактозу, мальтулозу, изомальтулозу и лактулозу. Примеры невосстанавливающих сахаров включают невосстанавливающие гликозиды полигидроксисоединений, выбранные из сахарных спиртов и других многоатомных спиртов с прямой цепью. Моногликозиды включают соединения, полученные восстановлением дисахаридов, таких как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза.

[0056] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол выбран из группы, состоящей из моносахарида, дисахариды, циклического полисахарида, сахарного спирта, линейного разветвленного декстрана и линейного неразветвленного декстрана или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол представляет собой дисахарид, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита и сорбита или их комбинации.

[0057] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации,

составляющей от приблизительно 0% до приблизительно 40% вес/об., или от приблизительно 0% до приблизительно 20% вес/об., или от приблизительно 1% до приблизительно 15% вес/об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 40% вес/об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей от приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14% до приблизительно 15% вес/об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации от приблизительно 1% до приблизительно 15% вес/об. В еще дополнительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей приблизительно 9%, приблизительно 9,5%, приблизительно 10%, приблизительно 10,5%, приблизительно 11%, приблизительно 11,5% или приблизительно 12% вес/об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации от приблизительно 9% до приблизительно 12% вес/об. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол (например, сахарид) содержится в композиции в концентрации, составляющей приблизительно 9% вес/об. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол выбран из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита и сорбита или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полиол является сахарозой и присутствует в композиции в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 9% до приблизительно 12% вес/об.

[0058] Если требуется, состав может также включать подходящие количества объемообразующих средств и средств для регуляции осмотического давления, таких как сахарид, подходящий для образования лиофилизированной "массы".

[0059] В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция или состав на основе маскированного антигенсвязывающего белка содержат 10 мМ глутамата или 10 мМ ацетата, 9% (вес/об.) сахарозы и 0,01% (вес/об.) полисорбата 80, при этом pH фармацевтической композиции или состава составляет 4,2 или 3,6.

#### *Поверхностно-активные вещества*

[0060] Фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, могут



дополнительно необязательно содержать по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества обычно используются в белковых составах для предупреждения поверхностно-индуцированного разложения. Поверхностно-активные вещества представляют собой амфипатические молекулы, обладающие способностью отеснять белки от положений на границах раздела фаз. Гидрофобные части молекул поверхностно-активных веществ занимают положения на границах раздела фаз (например, воздух/жидкость), тогда как гидрофильные части молекул остаются ориентированными по направлению к объему растворителя. При достаточных концентрациях (как правило, около критической мицеллярной концентрации детергента) поверхностный слой молекул поверхностно-активных веществ служит для предупреждения адсорбции молекул белков на границе раздела фаз. Таким образом, поверхностно-индуцированное разложение сводится к минимуму. Поверхностно-активные вещества включают, например, сложные эфиры жирных кислот сорбитанполиэтоксилатов, такие как полисорбат-20 и полисорбат-80 (см., например, Avonex®, Neupogen®, Neulasta®). Эти две молекулы отличаются только длиной алифатической цепи, которая придает гидрофобный характер молекулам, соответственно С-12 и С-18. Соответственно, полисорбат-80 является более поверхностно-активным и имеет более низкую критическую мицеллярную концентрацию, чем полисорбат-20. Поверхностно-активное вещество полоксамер 188 также использовалось в нескольких представленных на рынке жидких продуктах, таких как Gonal-F®, Norditropin® и Ovidrel®.

[0061] Детергенты могут также оказывать влияние на термодинамическую конформационную стабильность белков. Дестабилизации белков детергентами можно дать рациональное объяснение в контексте гидрофобных хвостов молекул детергентов, которые могут участвовать в специфическом связывании с белками в частично или полностью развернутых состояниях. Такие типы взаимодействий могут вызывать сдвиг конформационного равновесия в сторону более развернутых состояний белка (т. е. увеличение доступности гидрофобных частей молекулы белка в дополнение к связыванию полисорбата). В качестве альтернативы, если белок в нативном состоянии имеет несколько гидрофобных поверхностей, связывание детергента с белком в нативном состоянии может стабилизировать эту конформацию.

[0062] Другой аспект полисорбатов заключается в том, что они по своей природе являются восприимчивыми к окислительному разложению. Часто в качестве исходных материалов они содержат достаточные количества пероксидов для того, чтобы вызвать окисление боковых цепей остатков в белках, в частности метионина. Потенциальная возможность окислительного повреждения вследствие добавления стабилизатора подчеркивает тот факт, что в составах необходимо использовать наиболее низкие эффективные концентрации вспомогательных веществ. Для поверхностно-активных веществ эффективная концентрация для данного белка будет зависеть от механизма стабилизации. Было высказано предположение, что если механизм стабилизации поверхностно-активного вещества связан с предупреждением поверхностной денатурации,

то эффективная концентрация будет находиться около критической мицеллярной концентрации детергента. Если же механизм стабилизации связан со специфическими взаимодействиями белка и детергента, то эффективная концентрация поверхностно-активного вещества будет связана с концентрацией белка и стехиометрией взаимодействия (Randolph T.W., et al., *Pharm Biotechnol.*, 13:159-75 (2002)).

[0063] Поверхностно-активные вещества можно также добавлять в соответствующих количествах для предупреждения поверхностной агрегации во время замораживания и высушивания (Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)). Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают без ограничения анионные, катионные, неионные, цвиттерсионные и амфотерные поверхностно-активные вещества, включающие поверхностно-активные вещества, полученные из встречающихся в природе аминокислот. Анионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия, хенодезоксихолевую кислоту, натриевую соль N-лауроилсаркозина, додецилсульфат лития, натриевую соль 1-октансульфоновой кислоты, гидрат холата натрия, дезоксихолат натрия и натриевую соль гликодезоксихолевой кислоты. Катионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения хлорид бензалкония или хлорид бензетония, моногидрат хлорида цетилпиридиния и бромид гексадецилтриметиламмония. Цвиттерсионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения CHAPS, CHAPSO, SB3-10 и SB3-12. Неионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения дигитонин, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 и TWEEN-80. В другом варианте осуществления поверхностно-активные вещества включают лауромакрогол-400; полиоксил-40 стеарат; полиоксиэтилен-10, 40, 50 и 60-гидрогенизированное касторовое масло; глицеринмоностеарат, полисорбат-20, 40, 60, 65 и 80; соевый лецитин и другие фосфолипиды, такие как DOPC, DMPG, DMPC и DOPG; сложный эфир сахарозы и жирной кислоты; метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу.

[0064] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут дополнительно необязательно содержать по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество либо отдельно, либо как смесь в разных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, составляющей от приблизительно 0,001% до приблизительно 5% вес/об. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,001, по меньшей мере 0,002, по меньшей мере 0,003, по меньшей мере 0,004, по меньшей мере 0,005, по меньшей мере 0,007, по меньшей мере 0,01, по меньшей мере 0,05, по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 0,2, по меньшей мере 0,3, по меньшей мере 0,4, по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 0,6, по меньшей мере 0,7, по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 1,0, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5, по меньшей мере 3,0, по меньшей мере 3,5, по меньшей мере 4,0 или по меньшей мере 4,5% вес/об. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в

концентрации, составляющей от приблизительно 0,004% до приблизительно 0,5% вес/об. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, составляющей от приблизительно 0,004, приблизительно 0,005, приблизительно 0,007, приблизительно 0,01, приблизительно 0,05, приблизительно 0,1, приблизительно 0,2, приблизительно 0,3 или приблизительно 0,4% вес/об. до приблизительно 0,5% вес/об. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество, которое включено в концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,01% вес/об. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-80, и при этом полисорбат-80 присутствует в концентрации приблизительно 0,01% вес/об.

#### *Другие аспекты*

[0065] Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, которая является подходящей для введения нуждающемуся в этом субъекту. Термины "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту, в частности субъекту-млекопитающему, для которого требуется введение фармацевтической композиции. Субъекты-млекопитающие включают людей, отличных от людей приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров и т. п., причем предпочтительными являются люди. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению является стабильной и фармацевтически приемлемой, т. е. способной вызывать требуемый терапевтический эффект, не вызывая каких-либо нежелательных местных или системных эффектов у субъекта, которому вводят фармацевтическую композицию. Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению могут, в частности, быть стерильными и/или фармацевтически инертными. В частности, термин "фармацевтически приемлемый" может означать одобрение регулирующего органа или другой общепризнанной фармакопеи для применения у животных и более конкретно у людей.

[0066] Фармацевтические композиции, предусмотренные настоящим изобретением, содержат маскированный антигенсвязывающий белок (например биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок). В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок предусмотрен в терапевтически эффективном количестве. Под "терапевтически эффективным количеством" понимается количество указанного маскированного антигенсвязывающего белка (включая, например, биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки), которое вызывает требуемый терапевтический эффект. Терапевтическую эффективность и токсичность можно определять стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, ED<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD<sub>50</sub> (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение доз между терапевтическим и токсическим эффектами является терапевтическим индексом, и оно может быть выражено

как соотношение ED50/LD50. Фармацевтические композиции, которые проявляют большие терапевтические индексы, обычно являются предпочтительными.

[0067] Составы на основе белков и антител, включающие фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, можно вводить парентерально. При введении парентерально, они должны быть стерильными. Стерильные разбавители включают жидкости, которые являются фармацевтически приемлемыми (безопасными и нетоксичными при введении человеку) и применимыми в получении жидкой фармацевтической композиции, такой как фармацевтическая композиция, восстановленная после лиофилизации. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-забуференный раствор (например, фосфат-забуференный солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Разбавители могут включать водные растворы солей и/или буферы.

[0068] Вспомогательные вещества являются добавками, которые включены в фармацевтическую композицию или состав, поскольку они либо придают, либо усиливают стабильность, доставку и технологичность лекарственного продукта. Несмотря на причину их включения вспомогательные вещества должны быть безопасными и переносимыми пациентами. Для лекарственных средств на основе белка и антител выбор вспомогательных веществ является в частности важным, поскольку они могут влиять как на эффективность, так и на иммуногенность лекарственного средства. Следовательно, белковые составы следует разрабатывать с подходящим выбором вспомогательных веществ, что позволяет получить подходящую стабильность, безопасность и товарные качества.

[0069] Вспомогательные вещества, описанные в данном документе, распределены либо по их химическому типу, либо по их функциональной роли в фармацевтической композиции/составе. С учетом идей и указаний, приведенных в данном документе, специалисты в данной области будут способны с легкостью варьировать количество или диапазон вспомогательного вещества без повышения вязкости до нежелательного уровня. Вспомогательные вещества можно выбирать для достижения требуемой осмоляльности (т. е. изотонический, гипотонический или гипертонический) конечного раствора, pH, требуемой стабильности, устойчивости к агрегации, или разложению, или осаждению, защиты в условиях замораживания, лиофилизации, или высоких температур, или других свойств. Разнообразие типов вспомогательных веществ известно из уровня техники. Иллюстративные вспомогательные вещества включают соли, аминокислоты, другие средства, регулирующие тоничность, поверхностно-активные вещества, стабилизаторы, объемообразующие средства, криопротекторные средства, лиопротекторные средства, антиоксиданты, ионы металлов, хелатирующие средства и/или консерванты.

[0070] Кроме того, если конкретное вспомогательное вещество указано в фармацевтической композиции или составе посредством, например, процентного содержания (%) вес/об., специалистам в данной области будет понятно, что также рассматривается эквивалентная молярная концентрация этого вспомогательного вещества.

*Другие стабилизаторы и объемообразующие средства*

[0071] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут дополнительно необязательно содержать по меньшей мере один стабилизатор (включая сахар, полимер и/или полиол). Стабилизаторы включают класс соединений, которые могут служить в качестве криопротекторов, лиопротекторов и стеклообразующих средств. Криопротекторные средства участвуют в стабилизации белков во время замораживания или в замороженном состоянии при низких температурах. Лيوпротекторные средства стабилизируют белки или антитела в виде твердой дозированной формы, высушенной посредством сублимации, путем сохранения конформационных свойств белка, подобных нативным, во время стадий дегидратации при сублимационном высушивании. Свойства в стеклообразном состоянии были классифицированы как "прочность" или "хрупкость" в зависимости от соответствующих релаксационных свойств, которые зависят от температуры. Важно, чтобы криопротекторные, лиопротекторные и стеклообразующие средства оставались в той же фазе, что и белок, с целью придания стабильности. Иллюстративные лиопротекторные средства включают без ограничения глицерин и желатин, а также сахара меллибиозу, мелезитозу, рафинозу, маннотриозу и стахиозу.

#### *Аминокислоты*

[0072] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе фармацевтические композиции дополнительно содержат одну или несколько аминокислот. Аминокислоты нашли широкое применение в составах или фармацевтических композициях на основе белков и антител в качестве буферов, объемообразующих средств, стабилизаторов и антиоксидантов. Гистидин и глутаминовая кислота используются для буферизации составов на основе белков и антител в рН, находящемся в диапазоне 5,5-6,5 и 4,0-5,5, соответственно. Имидазольная группа гистидина имеет  $pK_a=6,0$ , и карбоксильная группа боковой цепи глутаминовой кислоты имеет  $pK_a 4,3$ , что делает их подходящими для буферизации в их соответствующем диапазоне рН. Глутаминовая кислота находится в некоторых составах (например, Stemgen®). Гистидин обычно находится в представленных на рынке составах на основе белков/антител (например, Xolair®, Herceptin®, Recombinate®). Он предоставляет хорошую альтернативу цитрату, буферу, известными тем, что они причиняют острую боль при инъекции. Интересно, что также сообщалось о том, что гистидин имеет стабилизирующий эффект, в случае если применяется в высоких концентрациях как в жидких, так и в лиофилизированных формах выпуска (Chen B, et al., *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)). Также наблюдали, что гистидин (не более 60 мМ) снижает вязкость высококонцентрированного состава антитела. Однако в таком же исследовании авторы настоящего изобретения наблюдали повышенную агрегацию и обесцвечивание в гистидин-содержащих составах во время исследований с применением заморзания-оттаивания антител в контейнерах из нержавеющей стали. Авторы настоящего изобретения отнесли это к эффекту ионов железа, выщелоченных в результате коррозии стальных контейнеров. Другим предостережением относительно гистидина является то, что он подвергается фотоокислению в присутствии ионов металлов (Tomita M, et al., *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)). Использование метионина в качестве антиоксиданта в

составах кажется многообещающим; наблюдали, что он был эффективным против разнообразных типов окислительных стрессов (Lam XM, et al., *J Pharm Sci.*, 86(11): 1250-5 (1997)).

[0073] Аминокислоты глицин, пролин, серин и аланин стабилизируют белки или антитела. Глицин также является объемобразующим средством в лиофилизированных составах (например, Neumega®, Genotropin®, Humatrope®). Было показано, что аргинин является эффективным средством в ингибировании, агрегации и его использовали как в жидких, так и лиофилизированных составах (например, жидкие Activase®, Avonex®, Enbrel®). Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут дополнительно необязательно содержать любую одну или несколько из вышеуказанных аминокислот.

#### *Антиоксиданты*

[0074] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, дополнительно содержит один или несколько антиоксидантов. Окисление белковых остатков возникает из числа разных источников. Помимо добавления конкретных антиоксидантов, предупреждение окислительного повреждения белка включает тщательный контроль некоторого числа факторов во время процесса изготовления и хранения продукта, таких как атмосферный кислород, температура, воздействие светового излучения и химическое загрязнение. Наиболее широко используемыми фармацевтическими антиоксидантами являются восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов или хелатирующие средства. Антиоксиданты в составах на основе терапевтических белков или антител должны быть водорастворимыми и должны оставаться активными на протяжении всего срока годности продукта при хранении. Восстанавливающие средства и поглотители кислорода/свободных радикалов действуют посредством удаления активных форм кислорода из раствора. Хелатирующие средства, такие как EDTA, могут быть эффективными, связывая следовые количества загрязняющих веществ, представляющих собой ионы металлов, которые способствуют образованию свободных радикалов. Например, EDTA используется в жидком составе кислотного фактора роста фибробластов для ингибирования окисления цистеиновых остатков, катализируемого ионами металла. EDTA использовались в представленных на рынке продуктах, как например Kineret® и Ontak®. Соответственно, описанные в данном документе фармацевтические композиции могут дополнительно необязательно содержать любое одно или несколько из таких восстанавливающих средств, поглотителей кислорода/свободных радикалов и/или хелатирующих средств.

[0075] Однако антиоксиданты сами по себе могут способствовать другим ковалентным или физическим изменениям белка. Некоторое количество таких случаев описано в литературе. Восстанавливающие средства (как например, глутатион) могут обуславливать разрушение внутримолекулярных дисульфидных связей, что может приводить к перестановке дисульфидов. Было показано, что в присутствии ионов

переходных металлов аскорбиновая кислота и EDTA способствуют окислению метионина в числе белков и пептидов (Akers MJ, and Defelippis MR. Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. In: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)); Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, et al., *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004)). Сообщалось, что тиосульфат натрия снижает уровни окисления метионина, индуцированного световым излучением и температурой, в rhuMab HER2; однако также в данном исследовании сообщалось об образовании аддукта тиосульфат-белок (Lam XM, Yang JY, et al., *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997)). Выбор подходящего антиоксиданта делали в соответствии с конкретными стрессами и видами чувствительности маскированного антигенсвязывающего белка.

#### *Ионы металлов*

[0076] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько ионов металлов. В целом, ионы переходных металлов являются нежелательными в составах или фармацевтических композициях на основе белка или антитела, поскольку они могут катализировать физические и химические реакции разложения белков. Однако конкретный ион металла включают в составы, если они представляют собой кофакторы для белков, с которыми они образуют координационные комплексы (например, цинковая суспензия инсулина). Недавно было предложено использование ионов магния (10-120 мМ) для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту (см., например, международную публикацию заявки на патент № WO 2004/039337). Иллюстративные ионы металлов включают без ограничения ионы  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Fe}^{+2}$ .

#### *Консерванты*

[0077] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько консервантов. Консерванты необходимы в разработке многофазных составов для парентерального введения, которые включают более чем один отбор из одного контейнера. Их основная функция заключается в подавлении роста микробов и обеспечении стерильности продукта в течение всего срока годности или срока использования лекарственного продукта. Широко применяемые консерванты включают фенол, бензиловый спирт, мета-крезол, алкильные парабыны, такие как метилпарабен или пропилпарабен, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Другие примеры соединений с антимикробной консервантной активностью включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония и хлорид гексаметония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как бутиловый спирт, фенол, бензиловый спирт, атекол, резорцин, циклогексанол и 3-пентанол.

[0078] Многофазные формы выпуска в виде инъекционных ручек необязательно включают составы, содержащие консервант. Например, составы на основе hGH, содержащие консервант, в настоящее время доступны на рынке. Norditropin® (жидкий, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (жидкий, Genentech) & Genotropin (лиофилизированный -

двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе® (Eli Lilly) составлен с мета-крезолом.

[0079] При составлении и разработке дозированных форм с добавлением консервантов необходимо учитывать несколько аспектов. Оптимизация концентрации консерванта включает испытание данного консерванта в дозированной форме с диапазонами концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка. Например, три консерванта были успешно подвергнуты скринингу во время разработки жидкого состава для рецептора интерлейкина 1 (I типа) с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Консерванты ранжировали по порядку, исходя из их влияния на стабильность при концентрациях, обычно используемых в представленных на рынке продуктах (Remmele RL Jr., et al., *Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998)).

[0080] Некоторые консерванты могут вызывать реакции в месте инъекции, что является еще одним фактором, который необходимо рассматривать при выборе консерванта. В клинических испытаниях, которые сосредоточены на оценивании консервантов и буферов для Norditropin, наблюдалось снижение восприятия боли при использовании составов, содержащих фенол и бензиловый спирт, по сравнению с составом, содержащим м-крезол (Kappelgaard A.M., *Horm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004)). Интересно, что среди широко используемых консервантов бензиловый спирт обладает анестезирующими свойствами (Minogue SC, and Sun DA., *Anesth Analg.*, 100(3): 683-6 (2005)).

[0081] Настоящее изобретение также предполагает фармацевтическую композицию, которая не содержит каких-либо консервантов.

#### *Маскированные антигенсвязывающие белки*

[0082] Описанные в данном документе фармацевтические композиции или составы содержат маскированный антигенсвязывающий белок. "Маскированный антигенсвязывающий белок" представляет собой белок, который включает маскирующий домен (MD), соединенный (например, через ковалентную связь или линкер) с антигенсвязывающим доменом (AB) так, что присоединение MD ингибирует или снижает активность связывания AB с антигеном, которые он распознает. MD дополнительно содержит сайт распознавания белка (PR), который включает субстрат или сайт связывания белка или протеазы так, что когда белок или протеаза расщепляют сайт распознавания белка и/или связываются с ним, AB-домен связывает антиген или связывание с антигеном посредством AB-домена повышается или индуцируется. Маскированные антигенсвязывающие белки ранее были описаны, например, в международной публикации № WO 2017/040344, патенте США № 9540440, публикации США № 20150118254, патенте США № 9127053, патенте США № 9517276 и патенте США № 8563269, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в его полном объеме. В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок представляет собой Probody (как описано, например, на фигуре 11; или в Polu KR and Lowman HB. Expert Opin



Biol Ther. 2014 Aug;14(8):1049-53; или в Desnoyers LR et. al., Sci Transl Med. 2013 Oct 16; 5(207)) или пролекарство ProTIA (как описано, например, на фигуре 12 или в Schellenberger V. Amunix unveils next-generation immuno-oncologic cancer therapy platform. <https://biopharmadealmakers.nature.com>. September 2016 edition, B20; см. также <http://www.amunix.com/technology/pro-tia/>). В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок содержит следующую структурную группировку от N-конца к С-концу: MD-AB или AB-MD. В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок включает в себя связывающий пептид (LP), и при этом маскированный антигенсвязывающий белок содержит следующую структурную группировку от N-конца к С-концу: MD-LP-AB или AB-LP-MD.

[0083] Как рассмотрено выше, термин "маскированные антигенсвязывающие белки" относится к маскированному антигенсвязывающему белку как в не подвергавшемся воздействию состоянии, так и в состоянии, когда белок или протеаза связываются с сайтом связывания или субстратом в сайте распознавания белка (PR) маскированного антигенсвязывающего белка, что может приводить в результате к расщеплению PR или способствовать структурному конформационному изменению (т. е. активному состоянию). Соответственно, специалисту в данной области будет очевидно, что в некоторых вариантах осуществления у маскированного антигенсвязывающего белка может отсутствовать MD по причине расщепления PR протеазой, в результате чего высвобождается по меньшей мере MD (например, если MD не присоединен к маскированному антигенсвязывающему белку посредством ковалентной связи (например, дисульфидной связи между остатками цистеина)).

[0084] В случае если маскированный антигенсвязывающий белок в присутствии антигена находится в не подвергавшемся воздействию состоянии, - связывание AB с антигеном снижается или ингибируется по сравнению с активностью связывания AB с антигеном, в случае если маскированный антигенсвязывающий белок находится в активном состоянии (т. е., в случае если белок или протеаза связываются с PR и/или удаляют или дислоцируют MD). По сравнению с активностью связывания AB, не ассоциированного с MD (т. е. в случае если маскированный антигенсвязывающий белок находится в активном состоянии), способность маскированного антигенсвязывающего белка к связыванию антигена в не подвергавшемся воздействию состоянии снижена, например, на по меньшей мере приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или даже приблизительно 100% при измерении в анализах связывания *in vitro* и/или *in vivo*.

[0085] В некоторых вариантах осуществления сайт распознавания белка (PR) функционирует в качестве субстрата для протеазы, предпочтительно внеклеточной протеазы. PR может быть выбран на основе белка или протеазы, которые вырабатываются

клеткой (включая, например, опухолевые клетки), находящейся поблизости к клеткам, которые экспрессируют антиген, и/или вырабатываются клеткой (включая, например, опухолевые клетки), которая совместно локализована в ткани с требуемым антигеном АВ маскированного антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой активатор плазминогена u-типа (uPA, также называемый урокиназой), легумин и/или матриптазу (также называемую MT-SP1 или MTSP1). В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой матричную металлопротеазу (MMP). В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой одну из протеаз, описанных в Rawlings, N. and Salvesen, G. Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition). Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-12-382219-2, включенном в данный документ посредством ссылки для всех целей.

[0086] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут содержать маскированный антигенсвязывающий белок, содержащий АВ или MD с pI, которые являются кислотными (pH менее чем 7,0), нейтральными (pH приблизительно 7,0) или основными (pH более чем 7,0). В некоторых вариантах осуществления АВ-домены в биспецифическом или полиспецифическом антигенсвязывающем белке могут иметь кислотные, нейтральные и/или основные pI, в то время как MD могут также иметь кислотные, нейтральные и/или основные pI. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе фармацевтические композиции содержат маскированный антигенсвязывающий белок, содержащий АВ и MD с pI, которые являются и кислотными, и нейтральными или основными, или содержат АВ с кислотным pI и MD с нейтральным или основным pI. В других вариантах осуществления АВ может иметь нейтральный или основной pI, в то время как MD имеет кислотный pI.

[0087] В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которые специфически связывают антиген. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают антиген, представляют собой моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело с тяжелой цепью или однодоменное антитело с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой мышинное, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, scFv или scAb.

[0088] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают антиген, выбранный из группы, состоящей из EGFR, мезотелина, CDH3, CD3 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают антиген, выбранный из группы, состоящей из гормона, фактора роста, цитокина, рецептора клеточной поверхности или любого их лиганда. В некоторых вариантах осуществления антитело или

антигенсвязывающий фрагмент связывают антиген, выбранный из группы, состоящей из таких как цитокины, лимфокины, факторы роста или другие гематопоэтические факторы, включая без ограничения M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF $\alpha$ , TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, тромбопоэтин, фактор стволовых клеток и эритропоэтин. Дополнительные факторы роста для использования в данном документе включают ангиогенин, костный морфогенетический белок-1, костный морфогенетический белок-2, костный морфогенетический белок-3, костный морфогенетический белок-4, костный морфогенетический белок-5, костный морфогенетический белок-6, костный морфогенетический белок-7, костный морфогенетический белок-8, костный морфогенетический белок-9, костный морфогенетический белок-10, костный морфогенетический белок-11, костный морфогенетический белок-12, костный морфогенетический белок-13, костный морфогенетический белок-14, костный морфогенетический белок-15, рецептор IA костного морфогенетического белка, рецептор IB костного морфогенетического белка, нейротрофический фактор головного мозга, цилиарный нейротрофический фактор, рецептор  $\alpha$  цилиарного нейротрофического фактора, цитокин-индуцированный нейтрофильный хемотаксический фактор 1, цитокин-индуцируемый нейтрофильный хемотаксический фактор 2 $\alpha$ , цитокин-индуцируемый нейтрофильный хемотаксический фактор 2 $\beta$ ,  $\beta$ -фактор роста эндотелиальных клеток, эндотелин 1, эпителиальный нейтрофильный аттрактант, рецептор  $\alpha$ 1 нейротрофического фактора линии глиальных клеток, рецептор  $\alpha$ 2 нейротрофического фактора линии глиальных клеток, белок, связанный с ростом, белок  $\alpha$ , связанный с ростом, белок  $\beta$ , связанный с ростом, белок  $\gamma$ , связанный с ростом, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, инсулиноподобный фактор роста I, рецептор инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобный фактор роста II, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, фактор, ингибирующий лейкоз, рецептор  $\alpha$  фактора, ингибирующего лейкоз, фактор роста нервов, рецептор фактора роста нервов, нейротрофин-3, нейротрофин-4, фактор, стимулирующий рост пре-B-клеток, фактор роста стволовых клеток, рецептор фактора роста стволовых клеток, трансформирующий фактор роста  $\alpha$ , трансформирующий фактор роста  $\beta$ , трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1.2, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 2, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 3, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 5, латентный трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1, белок I, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белок II, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белок III, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , рецептор фактора некроза опухоли I типа, рецептор фактора некроза опухоли II типа, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа, а также химерные белки и их биологически или иммунологически активные фрагменты.

[0089] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывают антиген, выбранный из группы, состоящей из p53, KRAS, NRAS,

MAGEA, MAGEB, MAGEC, BAGE, GAGE, LAGE/NY-ESO1, SSX, тирозиназы, gp100/pmell7, Melan-A/MART-1, gp75/TRP1, TRP2, CEA, RAGE-1, HER2/NEU, WT1.

[0090] В иллюстративных аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывают антиген, который экспрессируется на поверхности иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок связывает кластер молекул дифференцировки, выбранный из группы, состоящей из: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11A, CD11B, CD11C, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD76, CD79 $\alpha$ , CD79 $\beta$ , CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD 115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CDw128, CD129, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 и CD182.

[0091] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из муромонаб-CD3 (продукт, представленный на рынке под торговым названием Orthoclone Okt3®), абциксимаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Reopro®), ритуксимаба (продукт, представленный на рынке под торговыми названиями MabThera®, Rituxan®) (патент США № 5843439), базиликсимаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Simulect®), даклизумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Zenarax®), паливизумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Synagis®), инфликсимаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Remicade®), трастузумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Herceptin®), алемтузумаба (продукт, представленный на рынке под торговыми названиями MabCampath®, Campath-1H®), адалимумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Humira®), тозитумомаб-I131 (продукт, представленный на рынке под торговым названием Веххар®), эфализумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Raptiva®), цетуксимаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Erbitux®), ибритумомаба тиуксетана (продукт, представленный на рынке под торговым названием Zevalin®), омализумаб (продукт, представленный на рынке под торговым названием Xolair®), бевацизумаба (продукт, представленный на рынке под

торговым названием Avastin®), натализумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Tysabri®), ранибизумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Lucentis®), панитумумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Vectibix®), экулизумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Soliris®), цертолизумаба пэгола (продукт, представленный на рынке под торговым названием Cimzia®), голимумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Simponi®), канакинумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Ilaris®), катумаксамаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Removab®), устекинумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Stelara®), тоцилизумаба (продукт, представленный на рынке под торговыми названиями RoActemra®, Actemra®), офатумумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Arzerra®), деносумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Prolia®), белимумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Benlysta®), раксибакумаба, ипилимумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Yervoy®) и пертузумаба (продукт, представленный на рынке под торговым названием Perjeta®). В иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой одно из антител к TNF альфа, таких как адалимумаб, инфликсимаб, этанерцепт, голимумаб и цертолизумаб пэгол; антител к IL1 $\beta$ , такого как канакинумаб; антител к IL12/23 (p40), таких как устекинумаб и бриакинумаб; и антител к IL2R, такого как даклизумаб. Примеры подходящих противораковых антител включают без ограничения антитела к BAFF, такие как белимумаб; антитела к CD20, такие как ритуксимаб; антитела к CD22, такие как эспратузумаб; антитела к CD25, такие как даклизумаб; антитела к CD30, такие как иратумумаб, антитела к CD33, такие как гемтузумаб, антитела к CD52, такие как алемтузумаб; антитела к CD152, такие как ипилимумаб; антитела к EGFR, такие как цетуксимаб; антитела к HER2, такие как трастузумаб и пертузумаб; антитела к IL6, такие как силтуксимаб; антитела к VEGF, такие как бевацизумаб; антитела к рецептору IL6, такие как тоцилизумаб.

[0092] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок. Биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки были описаны ранее. См., например, международную публикацию № WO 2017/040344; публикацию патента США № 2015/0079088 (включенный в данный документ посредством ссылки). "Биспецифический маскированный антигенсвязывающий белок," представляет собой маскированный антигенсвязывающий белок который связывает два разных антигена или эпитопа, в то время как "полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок," представляет собой маскированный антигенсвязывающий белок который распознает три или более разных антигенов или эпитопов.

[0093] В некоторых вариантах осуществления один домен антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (AB1) биспецифического или полиспецифического антигенсвязывающего белка характеризуется специфичностью к целевому антигену, и

другой домен антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (AB2) характеризуется специфичностью к другому целевому антигену. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (AB1) биспецифического или полиспецифического антигенсвязывающего белка характеризуется специфичностью к эпитопу целевого антигена, и другой домен антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (AB2) характеризуется специфичностью к другому эпитопу того же целевого антигена.

[0094] Биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере один маскирующий домен (MD), содержащий сайт распознавания белка (PR), где MD ингибируют или снижают активность связывания АВ с антигеном. По меньшей мере один MD содержит сайт распознавания белка (PR), который включает субстрат или сайт связывания белка или протеазы так, что когда белок или протеаза расщепляют сайт распознавания протеазы и/или связываются с ним, АВ-домен связывает антиген или связывание усиливается. Для биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка маскированный антигенсвязывающий белок предпочтительно содержит два MD (например MD1 и MD2), которые снижают способность каждого антигенсвязывающего домена (AB1 и AB2) связывать его соответствующий антиген или эпитоп.

[0095] Маскированные антигенсвязывающие белки и/или биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки, предусмотренные в данном документе, стабильны в кровотоке и активируются в предполагаемых участках терапии и/или диагностики, но не в нормальной (т. е. здоровой) ткани. Когда они в активном состоянии, маскированные антигенсвязывающие белки и/или биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки проявляют связывание с антигеном, которое по меньшей мере сравнимо с соответствующим у немодифицированного антитела или биспецифического или полиспецифического антигенсвязывающего белка (т. е. аналогичного антитела, которое не содержит маскирующий домен).

[0096] Термин "антитело" относится к белку в общепринятом формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные области. Например, антитело может представлять собой IgG, который характеризуется "Y-образной" структурой из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 50-70 кДа). Антитело содержит переменную область и константную область. В форматах IgG переменная область обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается от других антител, которые связываются с различными антигенами. См., например, Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the

Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999). Антитело может дополнительно необязательно содержать константный домен, так что антитело может представлять собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включающее любой из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Как правило, переменная область содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепей (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; см. также Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенные как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 согласно Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше). Константная область обеспечивает возможность антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы.

[0097] Термины "фрагмент антитела", "его фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент антитела" относятся к части интактного антитела. "Антигенсвязывающий фрагмент" или "его антигенсвязывающий фрагмент" относятся к части интактного антитела, которое связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать переменные области, определяющие антиген, интактного антитела. Примеры антигенсвязывающего фрагмента фрагментов антитела включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- и Fv-фрагменты, линейные антитела, scFv и одноцепочечные антитела.

[0098] В различных аспектах антитело представляет собой моноклональное антитело. В определенных аспектах антитело представляет собой человеческое антитело. В определенных аспектах антитело является химерным или гуманизированным. Термин "химерный" относится к антителу, содержащему домены из двух или больше разных антител. Химерное антитело может, например, содержать константные домены от одного вида и переменные домены от второго или, в более общем случае, может содержать фрагменты аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Как "химерный", так и "гуманизированный" часто относятся к антигенсвязывающим белкам, в которых объединены области от более чем одного вида. Химерное антитело также может содержать домены двух или больше различных антител от одного и того же вида. В одном варианте осуществления химерное антитело представляет собой CDR-привитое антитело.

[0099] Термин "гуманизированный" в случае использования в отношении антигенсвязывающих белков относится к антигенсвязывающим белкам (например, антителам), содержащим по меньшей мере CDR-область из источника, отличного от человеческого, и сконструированным таким образом, что они характеризуются структурой и иммунологической функцией, более сходными с таковыми у настоящих антител человека, чем у антител из исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от антитела человека, такого как антитело мыши, на каркасную область человека. Как правило, в гуманизированном антителе все антитело за исключением CDR кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или идентично такому антителу, за исключением его CDR. CDR, некоторые или все из которых

кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими из организма, отличного от человеческого, прививают на бета-складчатый каркас варибельной области антитела человека для создания антитела, специфичность которого определяется привитыми CDR. Создание таких антител описано, например, в международной публикации заявки на патент № WO 92/11018; Jones, 1986, Nature 321:522-525 и Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536, все из которых полностью включены посредством ссылки. "Обратная мутация" выбранных акцепторных остатков каркасного участка в соответствующие донорные остатки часто используется для восстановления аффинности, которая теряется в исходной привитой конструкции (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693761; 5693762; 6180370; 5859205; 5821337; 6054297 и 6407213, все из которых полностью включены посредством ссылки). Гуманизированное антитело в оптимальном случае также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека, и таким образом, как правило, будет содержать Fc-область человека.

[0100] Неограничивающие примеры полиспецифических антител включают триспецифические антитела, тетраспецифические антитела и т. п. Маскированные антигенсвязывающие белки, включая биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки, являются необязательно поливалентными; поливалентность относится к общему числу сайтов связывания на антителе, независимо от того, распознают ли сайты связывания одинаковые или разные антигены или эпитопы.

[0101] Биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, в различных вариантах осуществления связывают CD3 человека (SEQ ID NO: 3). Например, в различных аспектах биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки активируют Т-клетки посредством воздействия CD3ε на Т-клетки. То есть антитела агонизируют, стимулируют, активируют и/или усиливают CD3-опосредованную активацию Т-клеток. Типы биологической активности CD3 включают, например, активацию Т-клетки и другую передачу сигнала через взаимодействие между CD3 и антигенсвязывающими субъединицами Т-клеточного рецептора (TCR).

[0102] Биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки, раскрытые в данном документе, необязательно связываются с CD3ε с константой связывания ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкМ, например, в некоторых вариантах осуществления  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ или  $\leq 1$  нМ.

[0103] В различных аспектах маскированный антигенсвязывающий белок (например, биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок) связывает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Последовательность EGFR человека представлена под SEQ ID NO: 4. Полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки, раскрытые в данном документе, необязательно связываются с EGFR человека с константой связывания ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкМ, например, в некоторых вариантах осуществления  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ или  $\leq 1$  нМ.



[0104] В предпочтительных вариантах осуществления маскированный биспецифический или полиспецифический антигенсвязывающий белок связывает и CD3, и EGFR.

[0105] В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок является гетеродимерным так, что он включает антигенсвязывающий домен, который представляет собой Fab (например Fab IgG), и антигенсвязывающий домен, который представляет собой scFv. Например, в иллюстративном варианте осуществления маскированный антигенсвязывающий белок содержит тяжелую и легкую цепи (например, тяжелую и легкую цепи IgG), которые связывают одну мишень (например EGFR), и scFv-домен, который связывает вторую мишень (например, антиген поверхности Т-клетки, такой как CD3). Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антигенсвязывающий белок, в котором VL-область и VH-область соединены посредством линкера (например, посредством синтетической последовательности аминокислотных остатков, обычно длиной от приблизительно 15 до приблизительно 20 аминокислот) с образованием непрерывной белковой цепи, где линкер является достаточно длинным, чтобы обеспечить для белковой цепи возможность самосворачивания и образования одновалентного антигенсвязывающего участка (см., например, Bird et al., 1988, Science 242:423-26 и Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83). Примером линкера, подходящего для применения в scFv, является GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 1). Другие иллюстративные линкеры содержат по меньшей мере 4-5 аминокислот в диапазоне от приблизительно 4 остатков до приблизительно 20 остатков.

[0106] Иллюстративный формат для маскированного антигенсвязывающего белка содержит (i) две тяжелых цепи, содержащие scFv, функционально присоединенный к N-концу одной или обеих тяжелой(-ых) цепи(-ей), и (ii) две легких цепи, которые ассоциируются с тяжелыми цепями с образованием антигенсвязывающего домена, где scFv связывает CD3, и части Fab связывают EGFR. В данном примере антигенсвязывающий белок содержит три (или четыре) антигенсвязывающих домена, которые, как правило, связывают два или больше разных антигенов (или эпитопов). Примером линкера, подходящего для связывания scFv с вариабельной областью тяжелой цепи, является GGGGS (SEQ ID NO: 2). Иллюстративные линкеры содержат по меньшей мере 1 подходящий линкер, имеющий 4-5 аминокислот.

[0107] Маскированный антигенсвязывающий белок содержит маскирующий домен (MD), который соединен с антителом (AB) (например, посредством ковалентной связи или другой формы присоединения). Маскирующий домен (MD) содержит маскирующий пептид (или маскирующий полипептид) (MP) и сайт распознавания белка (PR). Маскирующий пептид (или маскирующий полипептид) может являться аминокислотным сегментом, который препятствует связыванию антигенсвязывающего домена с его антигеном. В общем, используются маскирующие пептиды, короткие последовательности длиной 5-15 аминокислот, хотя предусмотрены также более короткие и более длинные последовательности (т. е. маскирующие полипептиды). Маскирующие домены

дополнительно описаны, например, в международной публикации № WO 2017/040344; публикации патента США № 2015/0079088 (включена посредством ссылки в ее полном объеме, и в частности в отношении раскрытия о маскирующих доменах для использования с антителами, которые связывают EGFR) и публикации патента США № 2016/0194399 (включенной посредством ссылки в ее полном объеме, и в частности в отношении раскрытия о маскирующих доменах для использования с антителами, которые связывают CD3).

[0108] В некоторых вариантах осуществления маскирующий пептид (или маскирующий полипептид) (MP) присоединены к антигенсвязывающему домену (AB) посредством сайта распознавания белка (PR), который необязательно является частью большей линкерной последовательности (т. е. аминокислотного сегмента, который связывает MP с антигенсвязывающим белком). PR функционирует как субстрат (или сайт связывания) для белка или протеазы, предпочтительно внеклеточной протеазы. PR можно выбирать на основе белка или протеазы, которые вырабатываются клеткой (включая, например, опухолевые клетки), находящейся поблизости к клеткам, которые экспрессируют мишень, и/или вырабатываются клеткой (включая, например, опухолевые клетки), которая совместно локализована в ткани с требуемой мишенью для по меньшей мере одного AB маскированного антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой активатор плазминогена u-типа (uPA, также называемый урокиназой), легумин и/или матриптазу (также называемую MT-SP1 или MTSP1). В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой матричную металлопротеазу (MMP). В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой одну из протеаз, описанных в Rawlings, N. and Salvesen, G. Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition). Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-12-382219-2. В качестве альтернативы MP соединен с антигенсвязывающим белком посредством нерасщепляемого белоксвязывающего домена. В данном отношении PR необязательно представляет собой аминокислотную последовательность которая, через взаимодействие, например, с белком или протеазой, конформационно изменяется так, что регулирует положение MP, и при этом AB может беспрепятственно связывать мишень.

[0109] В различных аспектах настоящего изобретения биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок содержит MD для каждой антигенсвязывающей части конструкции (например AB1, AB2, AB3 и т. д.). Например, биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок, содержащий две части Fab и два scFv, может содержать два набора MD, которые независимо могут быть одинаковыми или разными. Для иллюстрации биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок содержит (i) два scFv, которые связывают CD3, и MD1 (необязательно одинаковый MD для каждого scFv), присоединенный к каждому scFv, и (ii) две части Fab, которые связывают EGFR, и MD2, присоединенный к каждому Fab (необязательно одинаковый MD для каждого Fab). В различных аспектах PR MD1 и MD2 содержат одинаковую белокраспознающую

последовательность, что способствует высвобождению MD для каждой связывающей области в одинаковой среде после взаимодействия с протеазой. MD может быть присоединен на N-конце или C-конце антигенсвязывающего домена до тех пор, пока MD способен препятствовать связыванию антигенсвязывающего домена с мишенью, и линкер не мешает связыванию, как только MD становится высвобожденным. В случае если антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, MD может быть функционально связан с переменной областью тяжелой цепи или переменной областью легкой цепи. В случаях когда биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок содержит интактное антитело, содержащее как антигенсвязывающий домен Fab, так и scFv, сочлененные с тяжелой цепью (т. е., "уложенная в стопку" конформация), MD, ассоциированный с антигенсвязывающим доменом Fab, предпочтительно сочленен с переменной областью легкой цепи.

[0110] В некоторых вариантах осуществления один АВ-домен (например, АВ1) в биспецифическом или полиспецифическом маскированном антигенсвязывающем белке взаимодействует с лигандом Т-клеточной поверхности, таким как CD3, и необязательно принимает форму scFv. Иллюстративные маскированные антигенсвязывающие белки, которые взаимодействуют с CD3, включают без ограничения описанные в международной публикации № WO 2017/040344, публикации патента США № 20160194399 (включенные посредством ссылки в их полном объеме).

[0111] В некоторых вариантах осуществления один АВ-домен (например, АВ2) в антигенсвязывающем белке взаимодействует с антигеном опухоли, таким как EGFR. Иллюстративные маскированные антигенсвязывающие белки, которые взаимодействуют с EGFR, включают без ограничения антитела, раскрытые в публикации патента США № 20150079088, раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки в его полном объеме.

[0112] В некоторых вариантах осуществления маскированный антигенсвязывающий белок (включая, например, биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок) модифицируют для изменения изоэлектрической точки антитела. Например, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько отрицательно заряженных рН-чувствительных аминокислот (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота) в одном или обоих маскирующих доменах замещена положительно заряженной аминокислотой (например, лизином или аргинином). В некоторых вариантах осуществления при замене аспарагиновой кислоты в одном или нескольких маскирующих фрагментах антитела рI может повышаться. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько отрицательно заряженных рН-чувствительных аминокислот (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота) в одном или обоих маскирующих доменах удалены или замещены нейтральной аминокислотой.

[0113] В то время как маскированный антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению (включая, например, биспецифический или полиспецифический

маскированный антигенсвязывающий белок) часто описывается в данном документе как структура, содержащая интактное антитело, настоящее изобретение также предусматривает применение антигенсвязывающих фрагментов антитела, у которых отсутствует по меньшей мере часть традиционной структуры из двух тяжелых цепей/двух легких цепей. Фрагмент, используемый как маскированный антигенсвязывающий белок, содержит антигенсвязывающий домен (AB), который функционально связан с маскирующим доменом (MD), как описано выше. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит два scFv, связанных подходящим линкером (например, сегментом аминокислот достаточной длины для того, чтобы обеспечить связывание scFv с его мишенью). Один или оба scFv присоединены к MD; в случае если оба scFv присоединены к MD, MD может быть одинаковым или разным (т. е. несмотря на то, что MP и/или PR разные, в различных аспектах является предпочтительным, чтобы PR был одинаковым).

[0114] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция или состав содержат маскированный антигенсвязывающий белок (например, биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок), в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 50 мкг до приблизительно 200 мг (или от приблизительно 500 мкг до приблизительно 150 мг, или от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг, или от приблизительно 50 мг до приблизительно 150 мг, или от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг, или от приблизительно 50 мг до приблизительно 75 мг). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит маскированный антигенсвязывающий белок (включая биспецифический или полиспецифический маскированный антитело-связывающий белок), в количестве, составляющем приблизительно 50 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 150 мкг, приблизительно 200 мкг, приблизительно 250 мкг, приблизительно 300 мкг, приблизительно 350 мкг, приблизительно 400 мкг, приблизительно 450 мкг, приблизительно 500 мкг, приблизительно 550 мкг, приблизительно 600 мкг, приблизительно 650 мкг, приблизительно 700 мкг, приблизительно 750 мкг, приблизительно 800 мкг, приблизительно 850 мкг, приблизительно 900 мкг, приблизительно 950 мкг, приблизительно 1 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 55 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 65 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 85 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 95 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 105 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 115 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 135 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 145 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 155 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 165 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 175 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 185 мг, приблизительно

190 мг, приблизительно 195 мг или приблизительно 200 мг.

[0115] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит маскированный антигенсвязывающий белок (например, биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок), в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/мл (или от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/мл, или от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/мл, или от 20 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или от приблизительно 1 до приблизительно 17 мг/мл, или от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг/мл, или от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/мл, или от приблизительно 3 до приблизительно 6 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит маскированный антигенсвязывающий белок в концентрации, составляющей приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, приблизительно 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 31 мг/мл, приблизительно 32 мг/мл, приблизительно 33 мг/мл, приблизительно 34 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 36 мг/мл, приблизительно 37 мг/мл, приблизительно 38 мг/мл, приблизительно 39 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 41 мг/мл, приблизительно 42 мг/мл, приблизительно 43 мг/мл, приблизительно 44 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл, приблизительно 46 мг/мл, приблизительно 47 мг/мл, приблизительно 48 мг/мл, приблизительно 49 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл.

*Дозировки и терапевтическое применение состава*

[0116] Термины "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяются как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичного прерывания заболевания и его осложнений у пациента, который уже страдает заболеванием. Количества или дозы, эффективные для этого применения, будут зависеть от состояния, подлежащего лечению (показания), доставляемой конструкции на основе антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и его ответа на терапевтическое средство, пути введения, размера (веса тела, площади поверхности тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего

состояния здоровья) пациента и общего состояния собственной иммунной системы пациента. Надлежащую дозу можно корректировать в соответствии с решением лечащего врача так, чтобы ее можно было вводить пациенту за один раз или посредством серии введений и с целью получения оптимального терапевтического эффекта.

[0117] Терапевтически эффективное количество маскированного антигенсвязывающего белка (например, биспецифического или полиспецифического маскированного антигенсвязывающего белка) предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов заболевания, или к предупреждению нарушений, или инвалидности из-за поражения заболеванием. Для лечения рака, опухолей или злокачественных клеток, экспрессирующих антиген, который распознается маскированным антигенсвязывающим белком (включая биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок), описанным в данном документе, терапевтически эффективное количество маскированного антигенсвязывающего белка, например, противоопухолевого клеточного антигена (например, EGFR)/биспецифического или полиспецифического маскированного антигенсвязывающего белка CD3 предпочтительно угнетает клеточное деление или рост опухоли на по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80% или по меньшей мере приблизительно 90% относительно пациентов, не подвергавшихся лечению. Способность молекулы ингибировать рост опухоли можно оценить на животной модели, прогностической в отношении эффективности.

[0118] Фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе, являются применимыми в лечении, уменьшении тяжести и/или предупреждении патологических медицинских состояний, как описано в данном документе, у нуждающегося в этом пациента. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение состава в организм, выделенную ткань или клетку пациента, у которого имеются заболевание/нарушение, симптом заболевания/нарушения или предрасположенность к заболеванию/нарушению, с целью лечения, излечения, смягчения, облегчения, изменения, исправления, уменьшения тяжести, улучшения или воздействия на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию. Термин "заболевание" относится к любому состоянию, в отношении которого будет наблюдаться польза от фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые являются причиной предрасположенности млекопитающего к рассматриваемому заболеванию. Термин "уменьшение интенсивности", используемый в данном документе, относится к любому улучшению состояния заболевания (например, у пациента, имеющего опухоль, или рак, или метастатический рак) посредством введения маскированного антигенсвязывающего белка нуждающемуся в этом субъекту. В контексте рака такое

улучшение может рассматриваться как, например, замедление или остановка прогрессирующей опухоли, или рака, или метастатического рака у пациента. Термин "предупреждение", используемый в данном документе, означает избегание появления или повторного появления заболевания или нарушения или их симптома. Например, в контексте рака "предупреждение" охватывает избегание появления или повторного появления опухоли, или рака, или метастатического рака у субъекта.

[0119] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения нарушения или заболевания, ассоциированных с антигеном (или антигенами), распознаваемым маскированным антигенсвязывающим белком, описанным в данном документе.

[0120] В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения пролиферативного заболевания, например, рака или опухолевого заболевания, включающий стадию введения нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Злокачественные новообразования (обычно называемые раком) обычно инвазируют и разрушают окружающую ткань и могут образовывать метастазы, т. е. они распространяются в другие части, ткани или органы организма. Следовательно, термин "метастатический рак" охватывает метастазы в другие ткани или органы, отличные от таковых, из которых происходит опухоль. Термины "нуждающийся в этом субъект" или "нуждающийся в лечении" включает тех, у кого уже есть нарушение, а также тех, у кого нарушение должно быть предупреждено. Нуждающийся в этом субъект или "пациент" включает человека или других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

#### *Пути введения*

[0121] Иллюстративные пути введения включают без ограничения топические пути (такие как накожный, ингаляционный, назальный, офтальмический, аурикулярный/ушной, вагинальный, мукозальный); энтеральные пути (такие как пероральный, гастроинтестинальный, сублингвальный, сублабиальный, буккальный, ректальный); и парентеральные пути (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставный, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, интравезикальный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасиновиальный, интралюминальный). Предпочтительно, фармацевтическую композицию вводят парентерально, например, внутривенно, подкожно или внутримышечно. Парентеральное введение можно осуществлять с помощью инъекции, такой как болюсная инъекция, или с помощью инфузии, такой как непрерывная инфузия. Введение можно осуществлять посредством депо для длительного высвобождения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно с помощью исходной болюсной инъекции с последующей непрерывной инфузией для

поддержания терапевтических циркулирующих уровней лекарственного продукта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде одноразовой дозы. Фармацевтические композиции можно вводить с использованием устройства медицинского назначения. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

[0122] Настоящее изобретение предусматривает лиофилизированную композицию, имеющую характеристики, описанные в данном документе. Если фармацевтическая композиция была лиофилизирована, то лиофилизированный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лيوфилизированный материал можно восстанавливать, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWFI), физиологическом солевом растворе, фосфатно-солевом буферном растворе (PSB) или в том же составе, в котором белок находился перед лиофилизацией. Изобретение предусматривает восстановленную композицию ранее лиофилизированной композиции, имеющей характеристики, описанные в данном документе. Фармацевтическую композицию можно вводить в виде единственного терапевтического средства или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами, такими как противораковые терапевтические средства, в случае необходимости, например, с другими белковыми и небелковыми лекарственными средствами. Такие лекарственные средства можно вводить одновременно с композицией по настоящему изобретению, как определено в данном документе, или по отдельности перед или после введения указанного состава в определенных временных интервалах и дозах.

#### *Наборы*

[0123] Как дополнительный аспект предусмотрены наборы, которые содержат одну или несколько фармацевтических композиций, описанных в данном документе, упакованы способом, который содействует их применению для введения субъекту. В одном варианте осуществления такой набор включает фармацевтическую композицию, описанную в данном документе (например, композицию, содержащую маскированный антигенсвязывающий белок (например, биспецифический или полиспецифический маскированный антигенсвязывающий белок)), упакованную в контейнер, такой как герметизированная бутылка, колба, одноразовый или многоразовый флакон, предварительно заполненный шприц или предварительно заполненное устройство для инъекций, необязательно с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или помещенной в упаковку, которая описывает применение соединения или композиции осуществляемым на практике способом. В одном аспекте композиция упакована в виде стандартной лекарственной формы. Набор может дополнительно содержать устройство, подходящее для введения композиции в соответствии с конкретным путем введения. Предпочтительно, набор содержит этикетку, которая описывает применение маскированного антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, или фармацевтической



композиции, описанной в данном документе.

[0124] Обычно для фармацевтической композиции по настоящему изобретению возможны различные формы хранения и/или дозированные формы в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозировки (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed., (2012)). Специалисту в данной области будет известно, что такой выбор конкретной дозированной формы может, например, влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* антитела.

Примеры

Пример 1

*Влияние стабилизатора в виде сахара (например, сахарозы) и низкого pH на агрегацию композиций маскированного антигенсвязывающего белка*

[0125] Получали композицию, содержащую биспецифический маскированный антигенсвязывающий белок (1 мг/мл) в 100 мМ глицина, pH 4,9 (состав А). Эта жидкая композиция демонстрировала значительную агрегацию непосредственно после хранения при 2-8°C или четырех недель при хранении при 2-8°C с примерно 27-28% высокомолекулярных (HMW) форм (см. фигуры 6, 7 и 10).

[0126] Для улучшения клинической применимости композиции путем улучшения стабильности и снижения агрегации и количества HMW-форм, в композиции осуществляли замену буфера на несколько составов (составы В-F) с pH, находящимся в диапазоне от pH 3,6 до pH 7,0, как описано ниже.

[0127] Состав В: 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, pH 3,6;

[0128] состав С: 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, pH 4,2;

[0129] состав D: 10 мМ ацетата, 9% сахарозы, pH 5,2;

[0130] состав E: 10 мМ фосфата, 9% сахарозы, pH 6,3; и

[0131] состав F: 10 мМ фосфаты, 9% сахарозы, pH 7,0.

[0132] Замену буфера осуществляли с помощью диализа исходной композиции в кассете с порогом 7000 кДа при 4°C в течение ночи с трехкратными заменами буфера. Диализированный материал помещали во флакон после добавления 0,01% полисорбата 80 и измеряли стабильность образцов в течение одного месяца при 2-8°C и 25°C. Конечная концентрация помещенного во флакон маскированного антигенсвязывающего белка в каждом составе составляла 1 мг/мл. Все образцы анализировали посредством эксклюзионной ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC) через две недели и четыре недели при 2-8°C и 25°C, соответственно. Результаты SE-UHPLC-анализа составов В-F представлены на фигурах 1-6, соответственно. Результаты SE-UHPLC-анализа состава А представлены на фигуре 10.

[0133] Как показано на фигуре 6А % высокомолекулярных (HMW) форм в значительной степени уменьшился в составах, где pH ниже, после четырех недель хранения при 2-8°C по сравнению с исходной композицией (т. е. составом А). Например, распределение составов маскированного антигенсвязывающего белка, описанных в данном

документе, от самого высокого до наименьшего количества наблюдаемой агрегации является следующим: состав А > состав F > состав E > состав D > состав C > состав В.

[0134] Эти данные уверенно предполагают, что стабильность, агрегация и клиническая применимость фармацевтической композиции, содержащей маскированный антигенсвязывающий белок, в значительной степени улучшается с помощью: (1) добавления сахара или стабилизатора (например, сахарозы), при этом включение сахара или стабилизатора (например, сахарозы) снижало агрегацию / % НМW-форм в ~3 раза; и (2) составления фармацевтической композиции при низком рН, при этом рН был ниже изоэлектрической точки (рI) АВ1-, АВ2-, MD1- и MD2-областей маскированного антигенсвязывающего белка, что дополнительно снижало агрегацию / % НМW-форм еще в ~3 раза. Значения рI АВ1-, АВ2-, MD1- и MD2-областей биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка определяли с использованием алгоритма Bjellqvist с получением паттерна, сравнимого с биспецифическим маскированным антигенсвязывающим белком 2, представленного в таблице 1. В случае составления при рН больше чем 4,54, оказалось, что отрицательно заряженная MD1 иначе покрывала положительно заряженный белок, что потенциально приводило к нестабильности раствора. При рН ниже 4 все компоненты (например АВ1, АВ2, MD1 и MD2) были положительно заряженными в разной степени, что создавало тем самым отталкивающие силы. Эти данные уверенно поддерживают идею о том, что комбинация сахара или стабилизатора (например, сахарозы) и низкого рН (где рН ниже изоэлектрической точки (рI) АВ1-, АВ2-, MD1- и/или MD2-областей маскированного антигенсвязывающего белка) синергетически или существенно снижала агрегацию / % НМW-форм в фармацевтических композициях, содержащих маскированный антигенсвязывающий белок (включая, например, биспецифические или полиспецифические маскированные антигенсвязывающие белки).

#### Пример 2

*Агрегация композиций биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка обратима с помощью добавления сахара или стабилизатора (например, сахарозы) и низкого рН*

[0135] В образце биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка с высокими исходными уровнями агрегации заменяли буфер на буфер для состава с низким рН (состав С), как описано в примере 1. Вкратце, замену буфера осуществляли с помощью диализа исходного материала в кассете с порогом 7000 кДа при 4°C в течение ночи с трехкратными заменами буфера. Процесс диализа приводил к значительному уменьшению в уровнях агрегации, что указывало на то, что состав с низким рН способен к обращению исходной агрегации. Проводили сравнение нулевого момента времени на фигуре 2В, для которого указано 3,91% НМW-форм в составе С, с фигурой 10В, на которой указано 28,49% НМW-форм для состава А. Это сравнение также продемонстрировано на фигуре 7В. Образцы анализировали с помощью эксклюзионной ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), методики, которая разделяет белки в растворе на основе их гидродинамического объема с использованием эксклюзионной

ультравысокоэффективной аналитической колонки.

[0136] Как показано на фигурах 8А-8В, диализированный материал при 1 мг/мл был стабильным после 0, 1 неделю и двух недель хранения при 4°C и 25°C. Увеличение уровней агрегации после хранения не наблюдалось. Образцы, которые хранили при 25°C, продемонстрировали незначительное уменьшение количества высокомолекулярных форм согласно SEC, что предполагало то, что агрегация могла быть обусловлена гидрофобными взаимодействиями.

[0137] Состав с низким рН (состав С) также был эффективным при стабилизации биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка при более высоких концентрациях. Белок в буфере для состава с низким рН (состав С) при 17 мг/мл характеризовался значительно более низкой агрегацией по сравнению с исходным материалом (составом А) при 11 мг/мл (фигура 9). Материал при 17 мг/мл был стабильным после 0, двух недель и 4 недель хранения при 4°C (фигура 9). Несмотря на то, что состав С продемонстрировал значительное снижение в агрегации / % НМВ-форм и улучшенную стабильность при 2-8°C или 25°C через 0, 2 недели и 4 недели (фигура 2) при сравнении с составом А (фигура 10), состав В при рН 3,6 продемонстрировал дополнительное снижение в агрегации / % НМВ-форм при сравнении с составом С. См., например, фигуру 6; см. также фигуру 1 и сравните с фигурой 2). Эти данные демонстрируют, что дополнительное снижение рН фармацевтической композиции, который уже ниже изоэлектрической точки (рI) АВ1-, АВ2-, MD1- и MD2-областей маскированного антигенсвязывающего белка, дополнительно снижает агрегацию маскированного антигенсвязывающего белка.

### Пример 3

*Влияние полиола (например, сахарозы) и низкого рН на агрегацию композиций маскированного антигенсвязывающего белка*

Определяли рI домена антитела (АВ1 и/или АВ2) и объемообразующее средство/маскирующий домен (MD1 и/или MD2) пролекарства ProTIA, содержащего аминокислотные последовательности, как описано в таблицах 5, 10 и/или 12 и/или на фигуре 36 или 37 международной публикации № WO 2017/040344. Далее, пролекарство ProTIA составляли в подходящем буфере (таком как 10 мМ глутамат или 10 мМ ацетат), наряду с подходящим полиолом (таким как 9% сахароза), необязательно с поверхностно-активным веществом (таким как 0,01% полисорбат 80), и при этом рН композиции понижали к значению между приблизительно 7,0-3,5 так, чтобы рН композиции был ниже рI домена антитела (АВ1 и/или АВ2) и объемообразующего средства/маскирующего домена (MD1 и/или MD2). Влияние полиола и низкого рН на агрегацию пролекарства ProTIA с низким рН будет оценено, как описано в примерах 1 и 2.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:
  - (a) маскированный антигенсвязывающий белок, содержащий
    - (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которые связываются с антигеном; и
    - (ii) маскирующий домен (MD1), соединенный с AB1, где маскирующий домен содержит
      - a. маскирующий пептид или маскирующий полипептид (MP1), которые ингибируют или снижают активность связывания AB1 с антигеном; и
      - b. сайт распознавания белка (PR1), где связывание с PR1 или его расщепление белком или протеазой повышает активность связывания AB1 с антигеном;
  - (b) по меньшей мере одно буферное средство и
  - (c) по меньшей мере один полиол,
 где pH фармацевтической композиции ниже изоэлектрической точки (pI) AB1- и MD1-областей маскированного антигенсвязывающего белка.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где маскированный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит:
  - (iii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которые связываются со вторым антигеном; и
  - (iv) второй маскирующий домен (MD2), соединенный с AB2, где второй маскирующий домен содержит
    - a. маскирующий пептид или маскирующий полипептид (MP2), которые ингибируют или снижают активность связывания AB2 с антигеном; и
    - b. сайт распознавания белка (PR2), где связывание с PR2 или его расщепление белком или протеазой повышает активность связывания AB2 со вторым антигеном,
 где pH фармацевтической композиции ниже изоэлектрических точек (pI) AB1-, AB2-, MD1- и MD2-областей маскированного антигенсвязывающего белка.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, где маскированный антигенсвязывающий белок представляет собой пролекарство на основе Probody или ProTIA.
4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, где AB1 и/или AB2 представляют собой scFv или Fab.
5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, где AB1 и/или AB2 связывают антиген, экспрессируемый на поверхности клетки.
6. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, где по меньшей мере одно буферное средство выбрано из группы, состоящей из ацетата, глутамата, цитрата, сукцината, тартрата, fumarата, малеата, гистидина, фосфата и 2-(N-морфолино)этансульфоната или их комбинации.
7. Фармацевтическая композиция по п. 6, где по меньшей мере одно буферное средство присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 5 до

приблизительно 200 мМ.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, где по меньшей мере одно буферное средство присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 50 мМ.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, где по меньшей мере один полиол выбран из группы, состоящей из сахарада, циклического полисахарида, сахарного спирта, линейного разветвленного декстрана и линейного неразветвленного декстрана или их комбинаций.

10. Фармацевтическая композиция по п. 9, где сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, где полиол выбран из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита, сорбита, ксилита, эритрита, изомальта, глицерина, циклодекстрина, каптизола или их комбинации.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, где по меньшей мере один полиол присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20% (вес/об.).

13. Фармацевтическая композиция по п. 12, где по меньшей мере один полиол присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 9 до приблизительно 12% (вес/об.).

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-13, дополнительно содержащая по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество.

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, где по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата-20, полисорбата-40, полисорбата-60, полисорбата-80, полуксамера-188, плуроника F68, тритона X-100, полиоксиэтилена3 и PEG 3350, PEG 4000 и PEG 8000 или их комбинации.

16. Фармацевтическая композиция по п. 14 или п. 15, где по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,5% (вес/об.).

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01% (вес/об.).

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-17, где рН композиции на приблизительно 2 единицы рН ниже, чем рI AB1, AB2, MD1 и/или MD2.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-17, где рН композиции составляет более чем приблизительно 3,5.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-19, где рН композиции составляет от 7,0 до 3,6.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-20, где рН композиции составляет от 4,0 до 5,0.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-21, где рН композиции

составляет от 3,5 до 5,5.

23. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-22, где рН композиции составляет приблизительно 4,2 или 3,6.

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-23, характеризующаяся осмолярностью, находящейся в диапазоне от 150 до 500 мОсм.

25. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-24, дополнительно содержащая вспомогательное вещество на основе аминокислоты.

26. Фармацевтическая композиция по п. 25, где вспомогательное вещество на основе аминокислоты присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мМ.

27. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-26, где композиция содержит 10 мМ глутамата, 9% (вес/об.) сахарозы и 0,01% (вес/об.) полисорбата-80, и где рН фармацевтической композиции составляет 4,2 или 3,6.

28. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-27, где маскированный антигенсвязывающий белок присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 30 мг/мл.

29. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-28, где маскированный антигенсвязывающий белок присутствует в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 50 мкг до приблизительно 200 мг.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-29, где фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированную композицию.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-30, где фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, где фармацевтическая композиция представляет собой восстановленную лиофилизированную композицию.

33. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-32, где композиция представляет собой жидкую композицию и является стабильной после хранения при 2-8°C, 4°C и/или 25°C в течение 0 недель, 1 недели, 2 недель, 4 недель, 2 месяцев, 6 месяцев, 1 года и/или 2 лет; или где композиция представляет собой лиофилизированную композицию и является стабильной после хранения при 2-8°C, 4°C и/или 25°C в течение 0 недель, 1 недели, 2 недель, 4 недель, 2 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет и/или 5 лет.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-33, где количество агрегатов антител является сниженным.

35. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-34, где количество высокомолекулярных форм антител является сниженным, как измерено с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC).

36. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-35, где количество агрегатов антител и/или высокомолекулярных форм антител является сниженным в приблизительно 1 раз, приблизительно 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 6 раз, приблизительно 7 раз, приблизительно 8 раз,

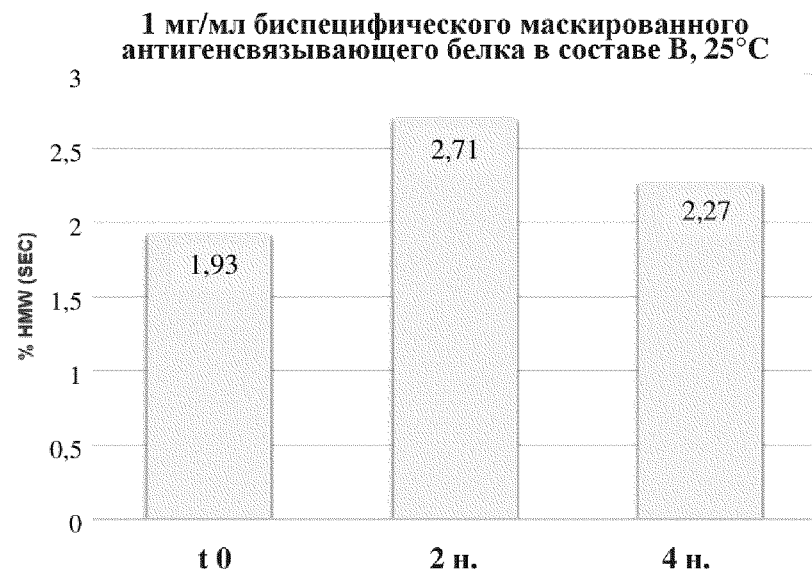
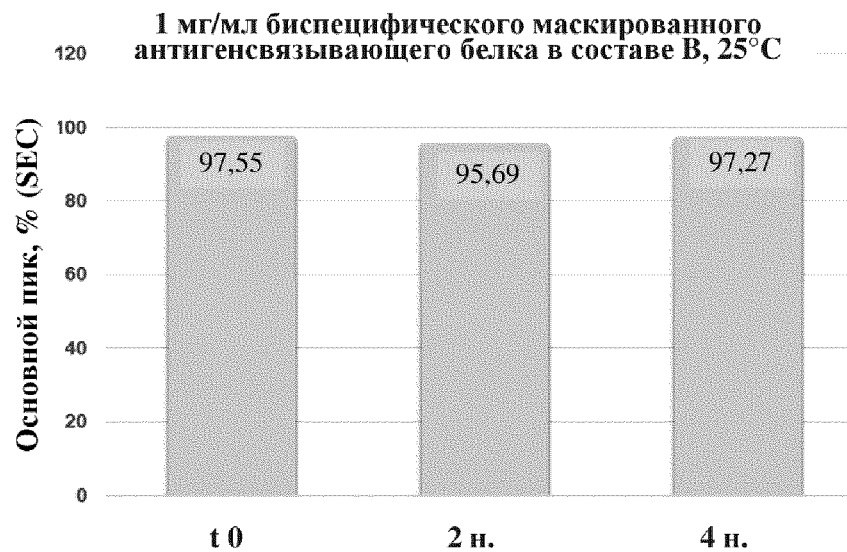
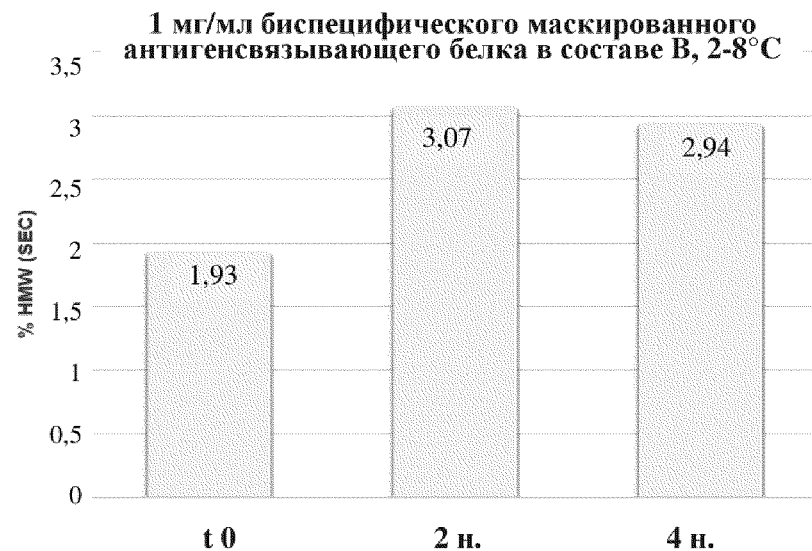
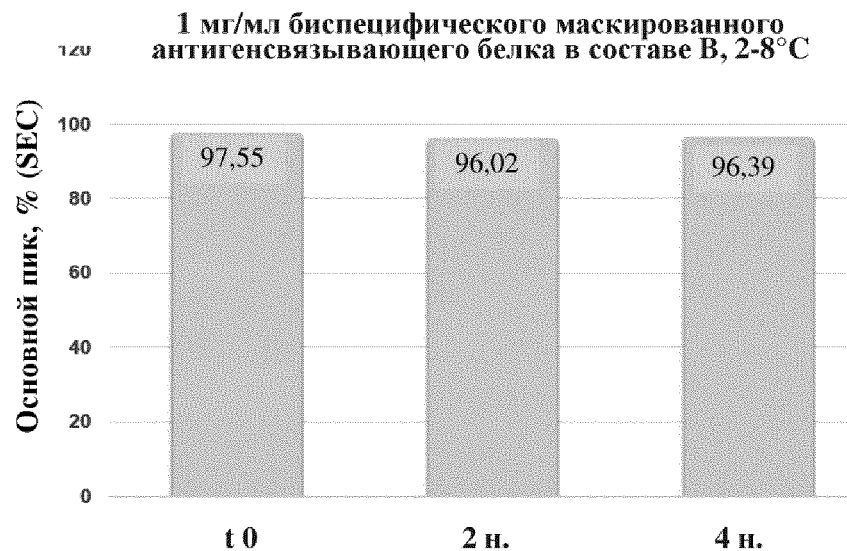
приблизительно 9 раз или приблизительно 10 раз по сравнению с эталонной фармацевтической композицией с более высоким рН, чем у фармацевтической композиции.

37. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-36, где рI измерена или определена с использованием алгоритма Bjellqvist.

38. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту композиции по любому из пп. 1-37.

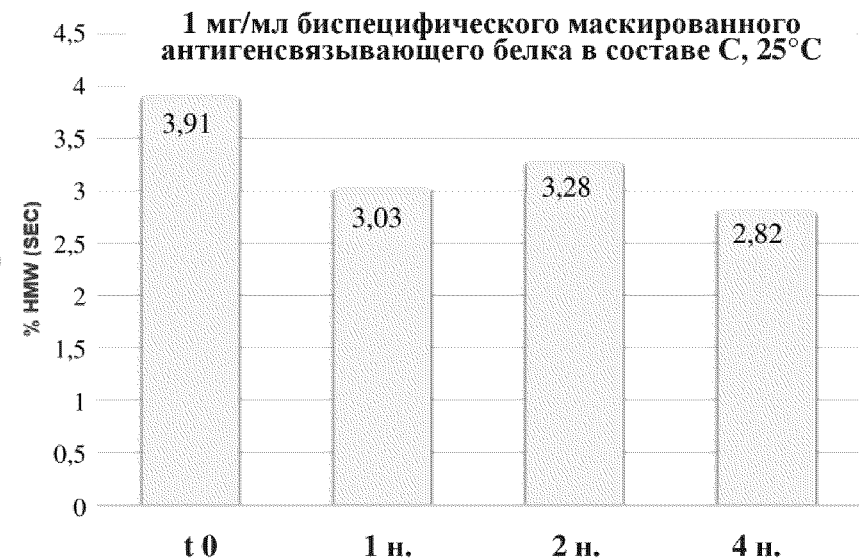
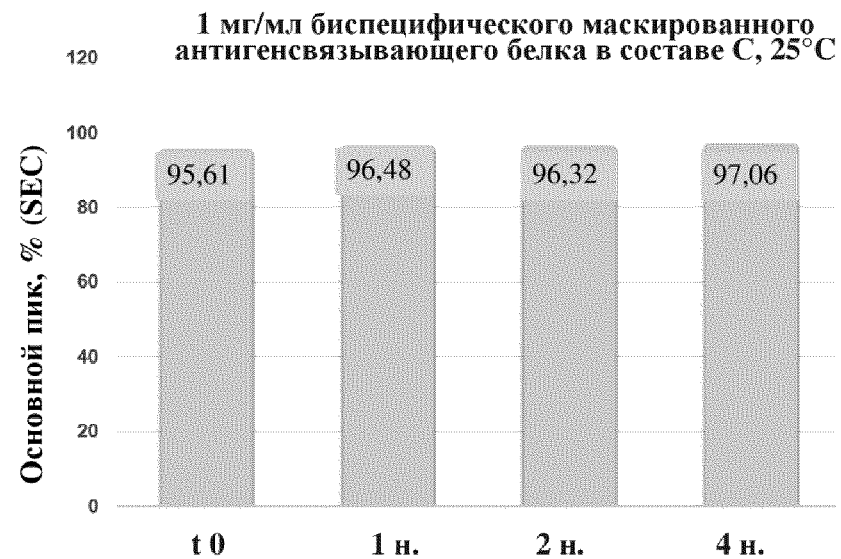
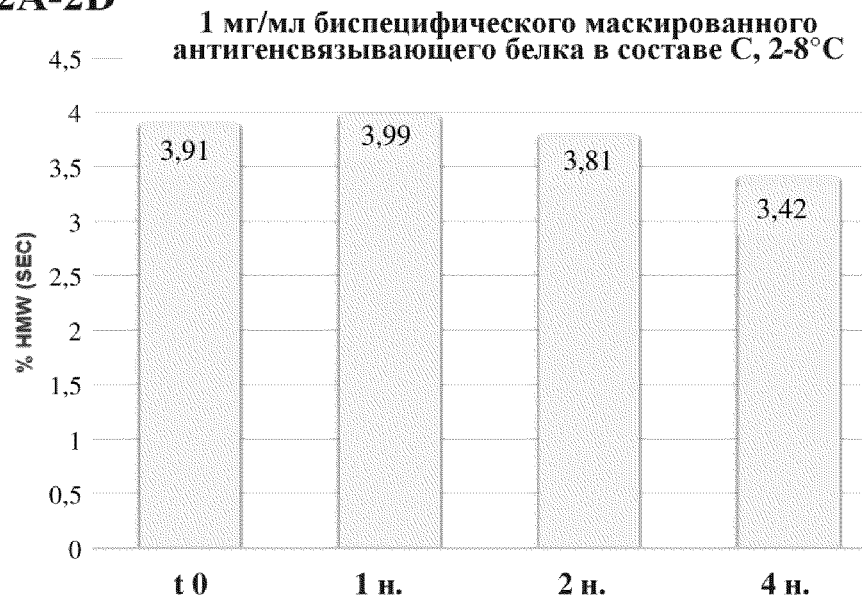
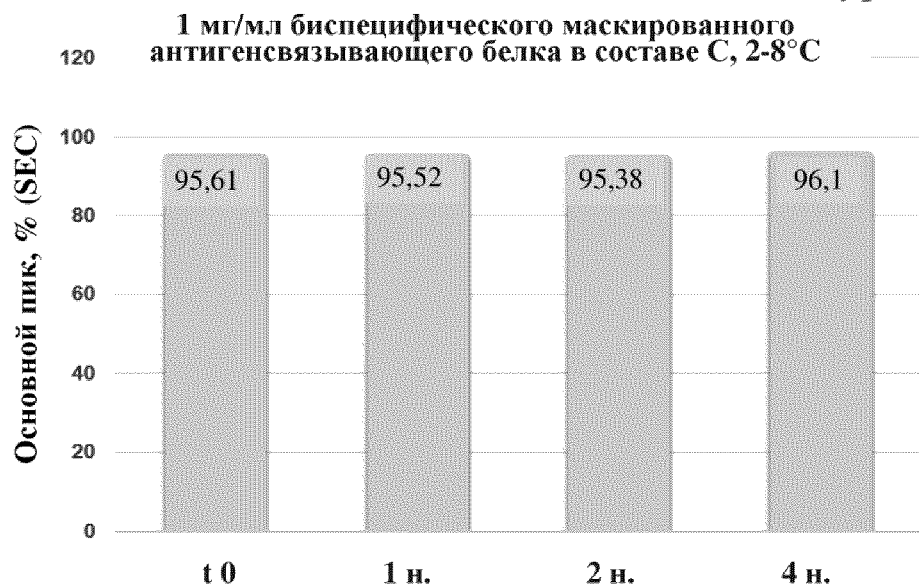
По доверенности

### Фигуры 1А-1D



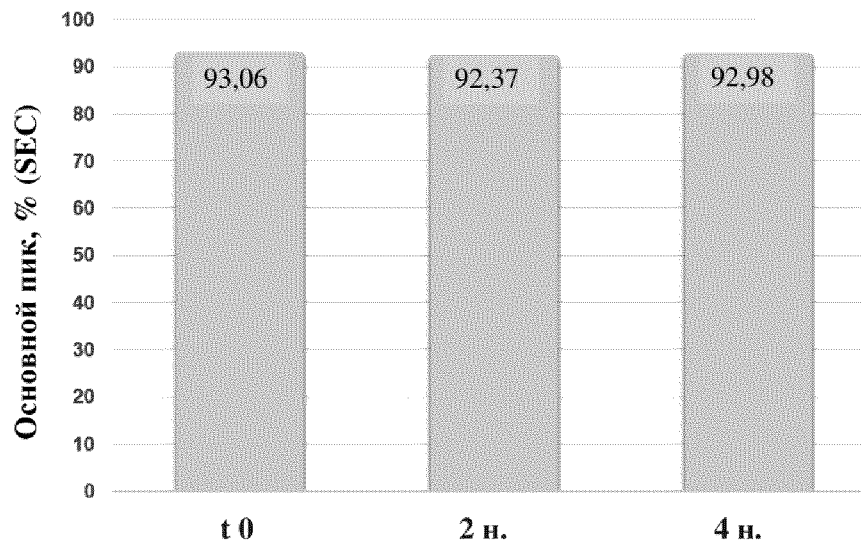


### Фигуры 2А-2D

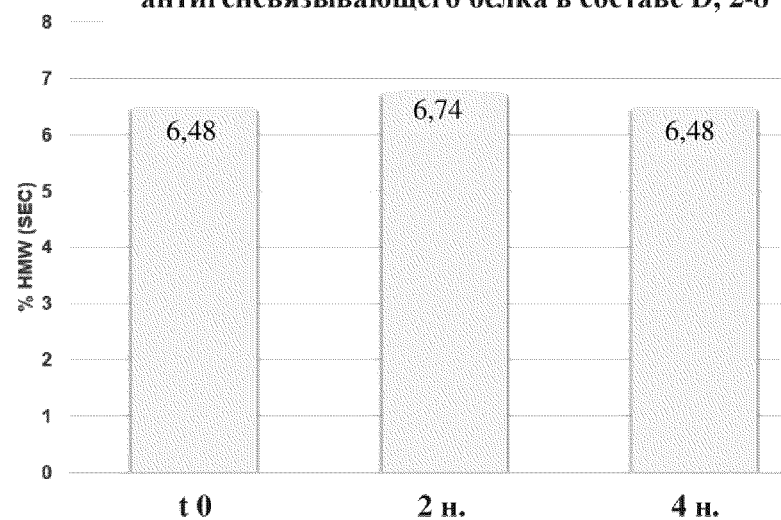


1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе D, 2-8°C

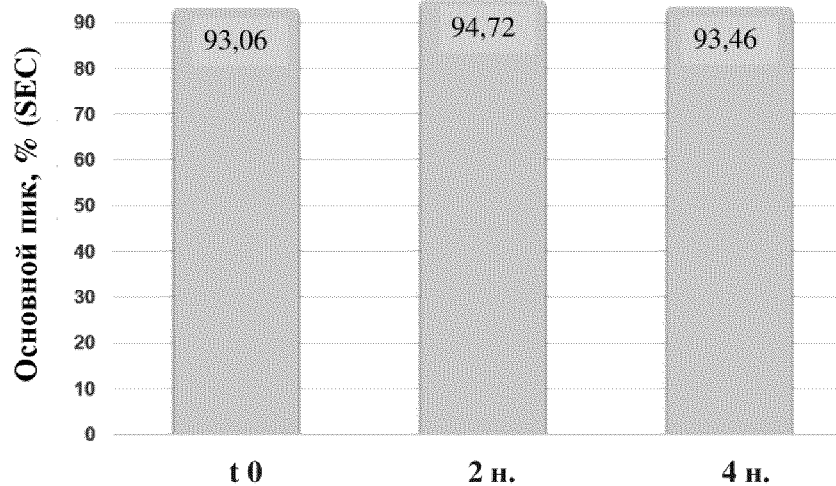
Фигуры 3А-3Д



1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе D, 2-8°C



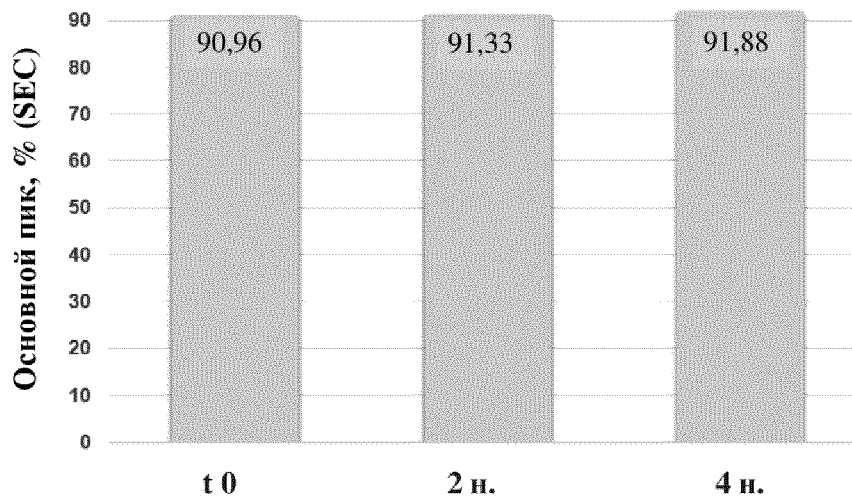
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе D, 25°C



1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе D, 25°C



1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе E, 2-8°C

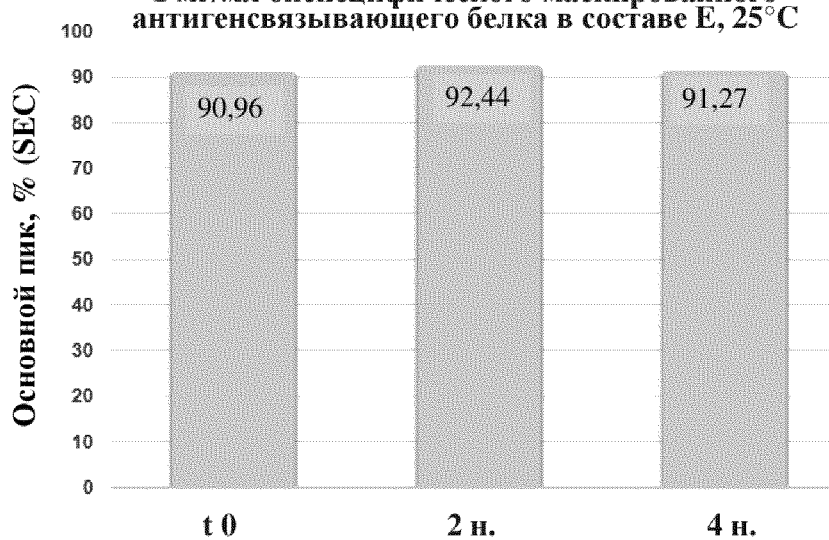


Фигуры 4А-4D

1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе E, 2-8°C



1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе E, 25°C

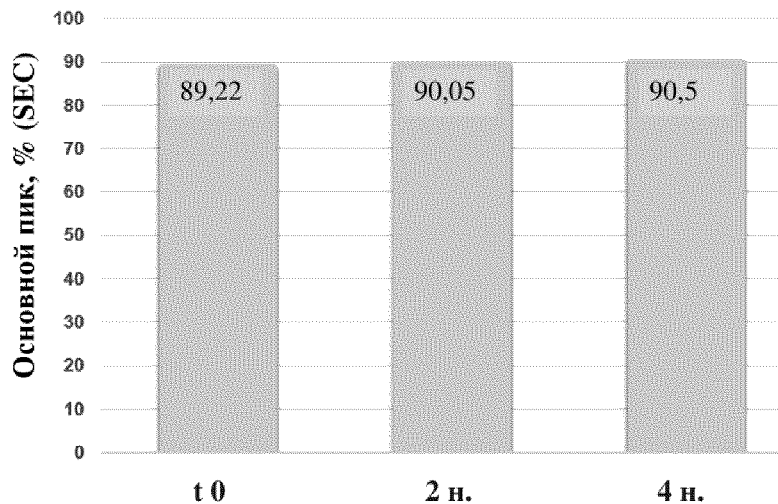


1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе E, 25°C

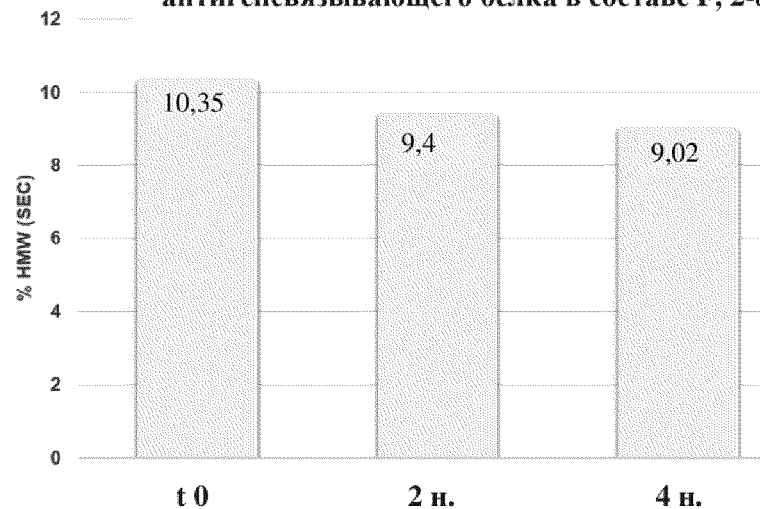


### Фигуры 5А-5D

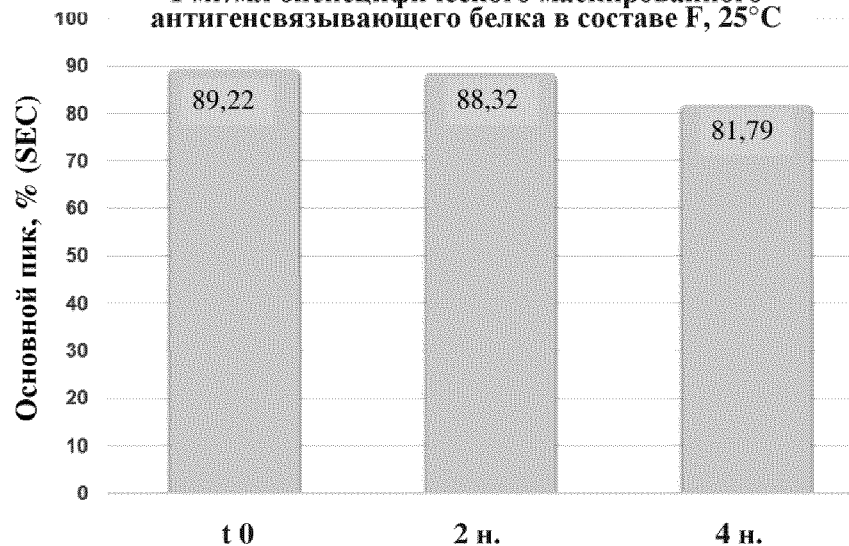
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе F, 2-8°C



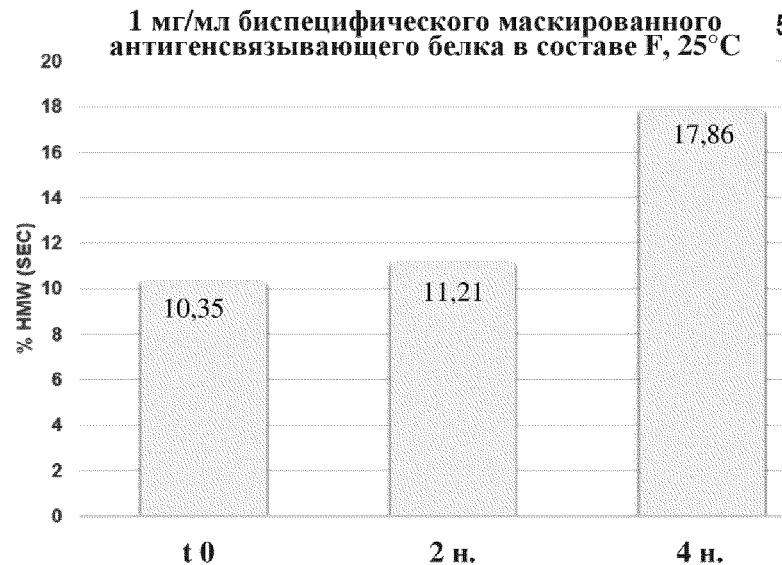
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе F, 2-8°C



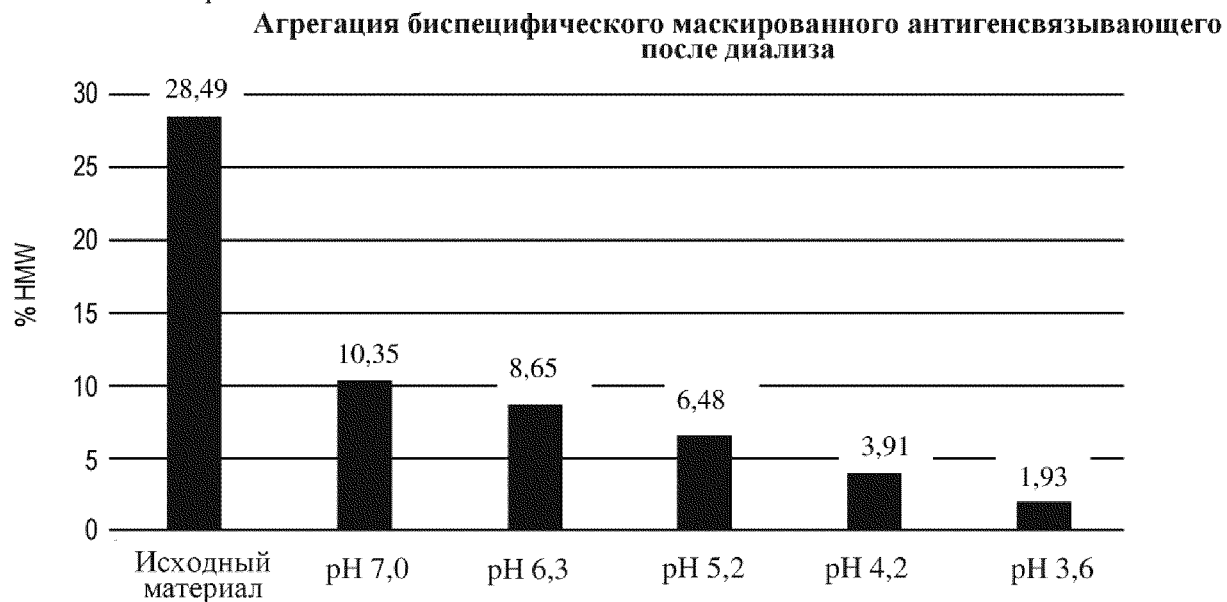
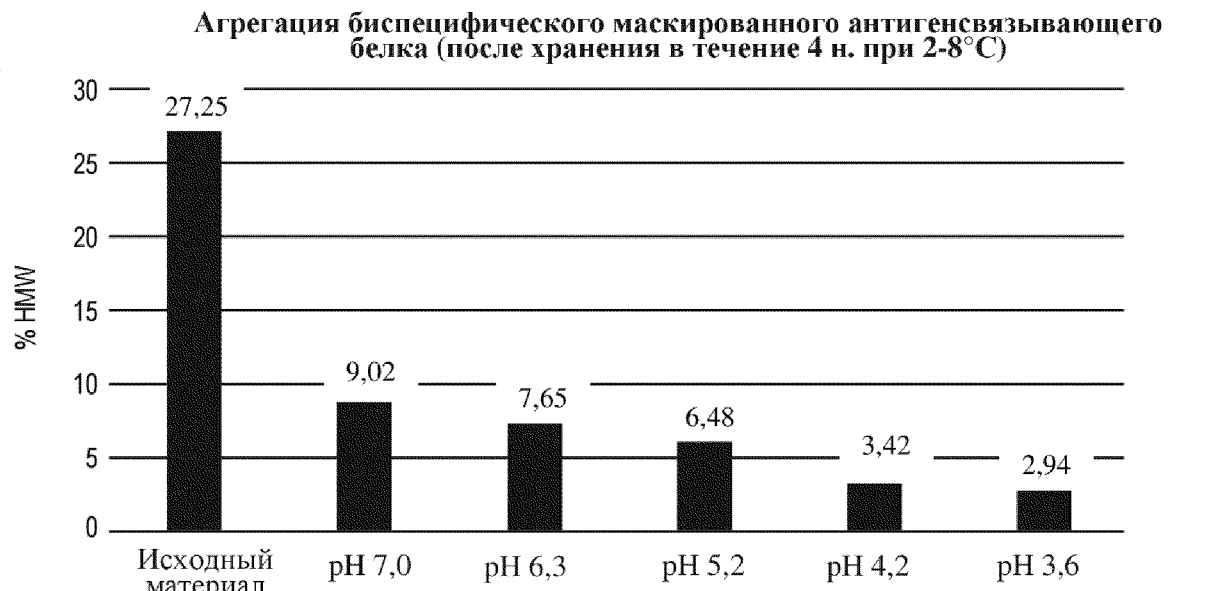
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе F, 25°C



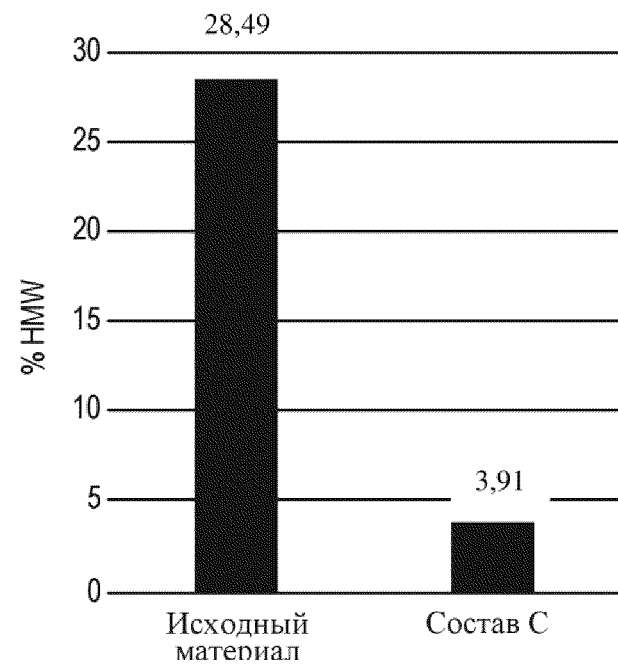
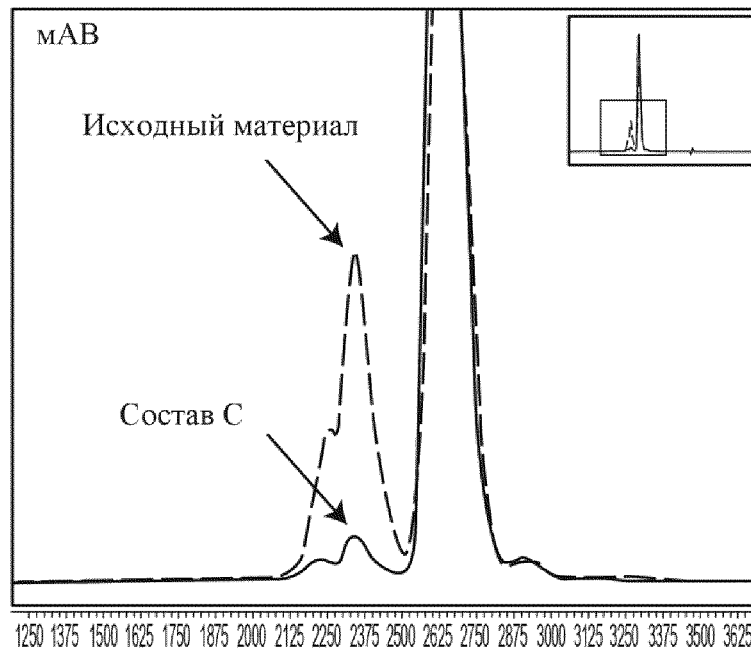
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе F, 25°C



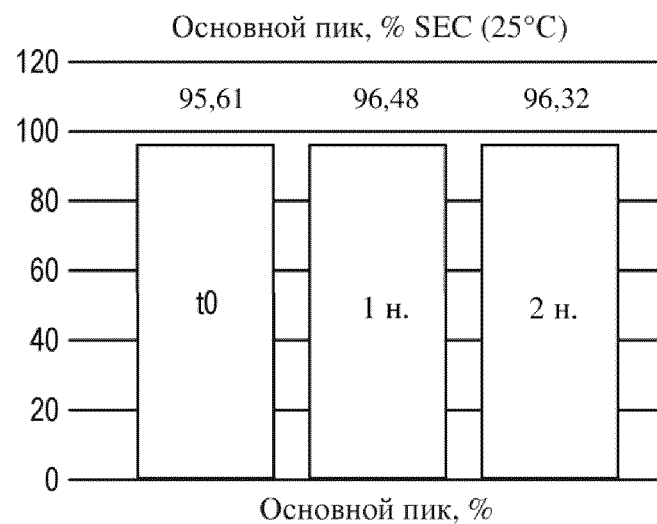
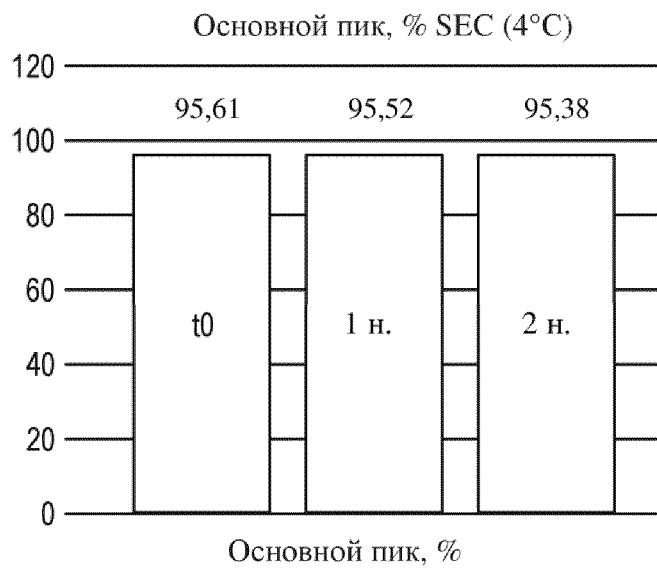
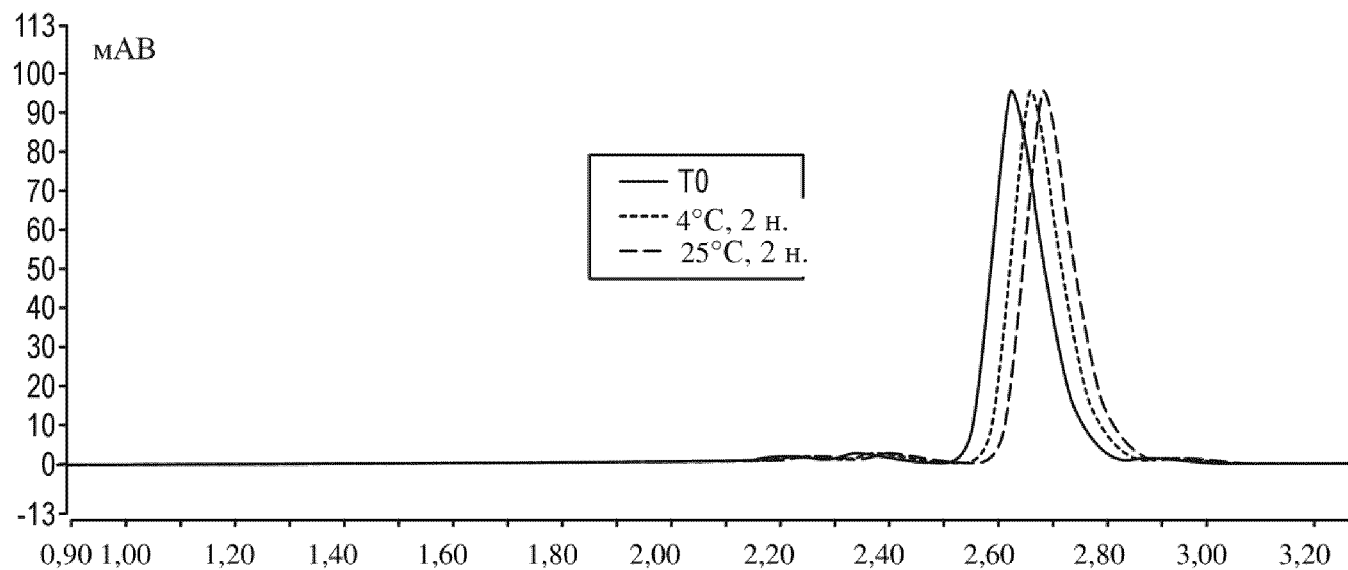
**Фигуры 6А-6В**



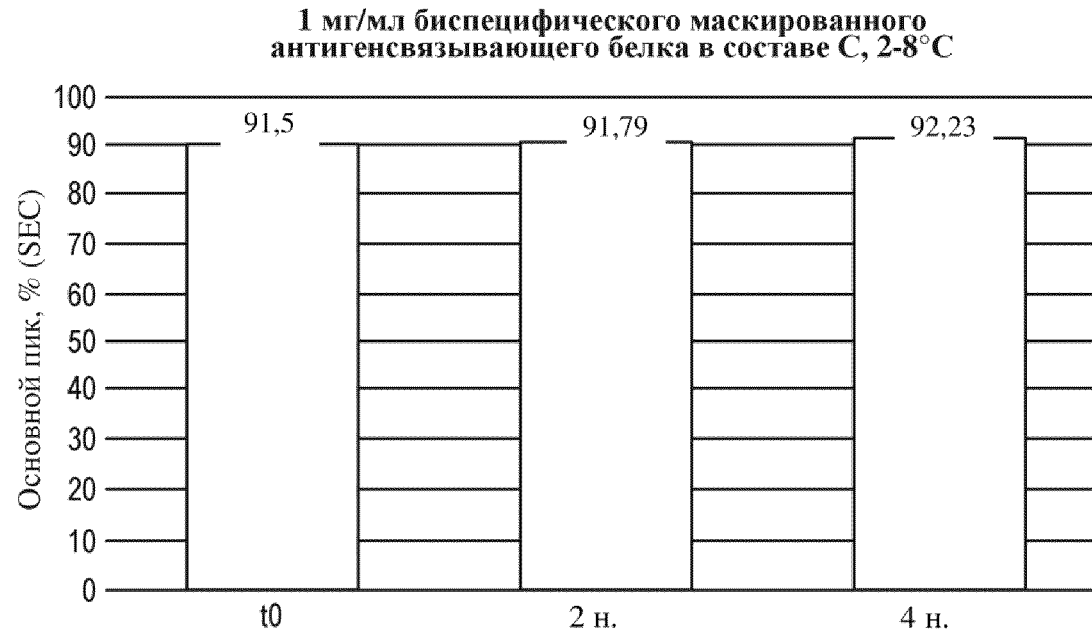
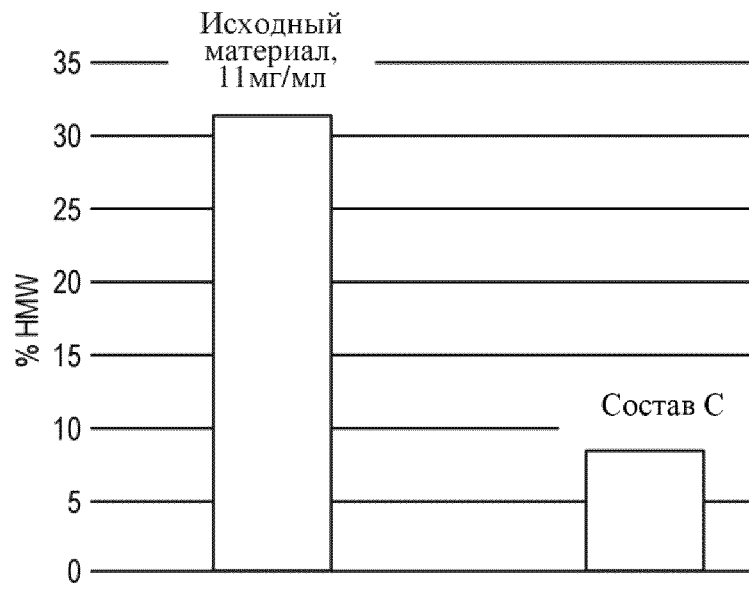
Фигуры 7А-7В



**Фигуры 8А-8В**



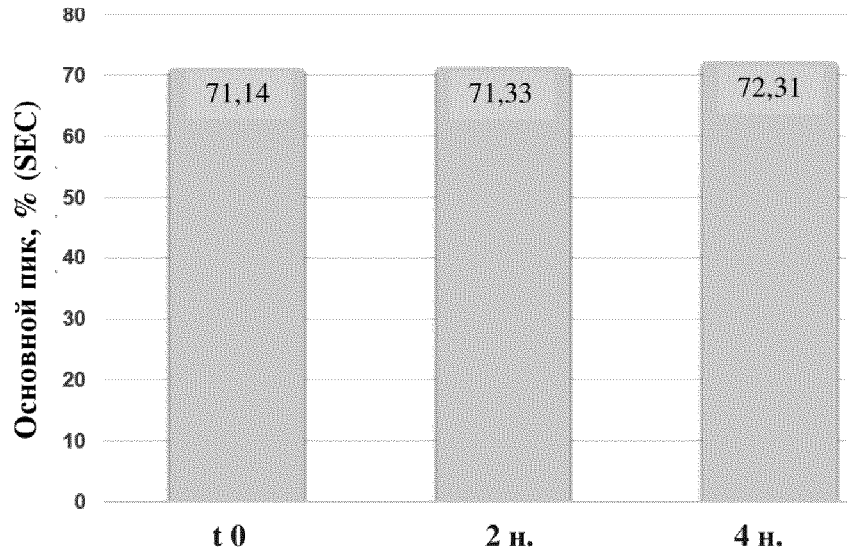
### Фигуры 9А-9В



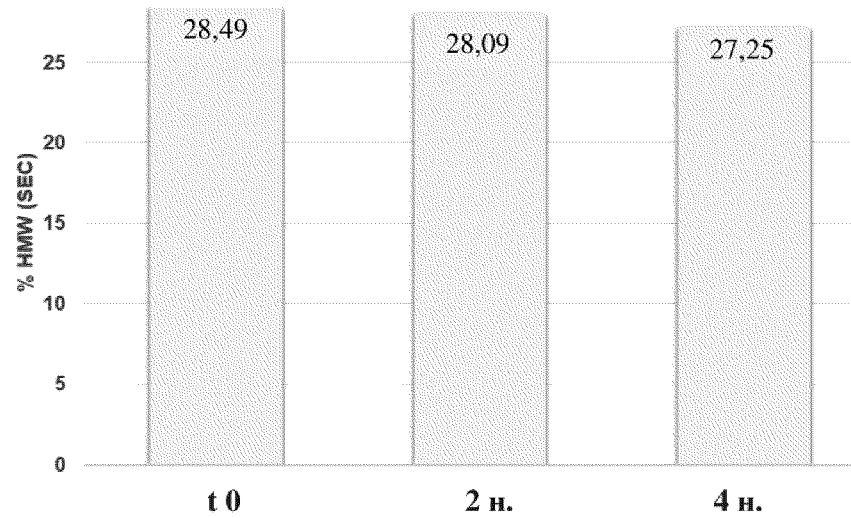


### Фигуры 10А-10D

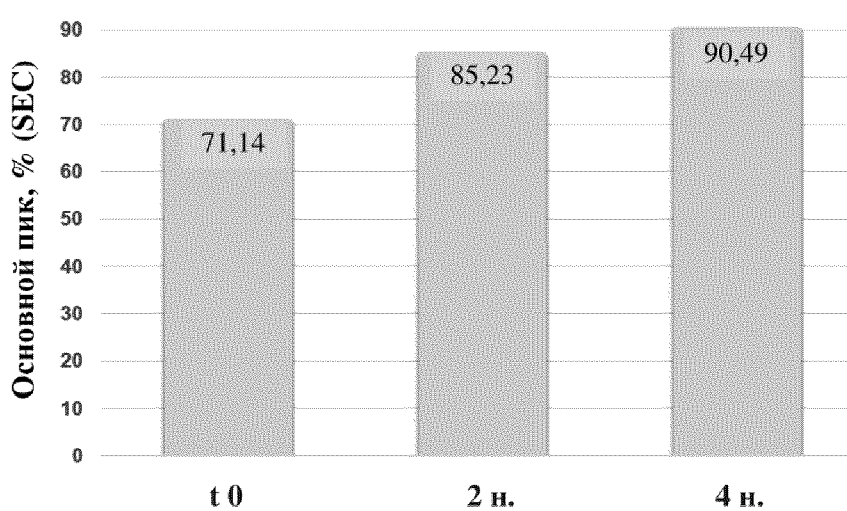
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе А, рН 4,9, 2-8°С



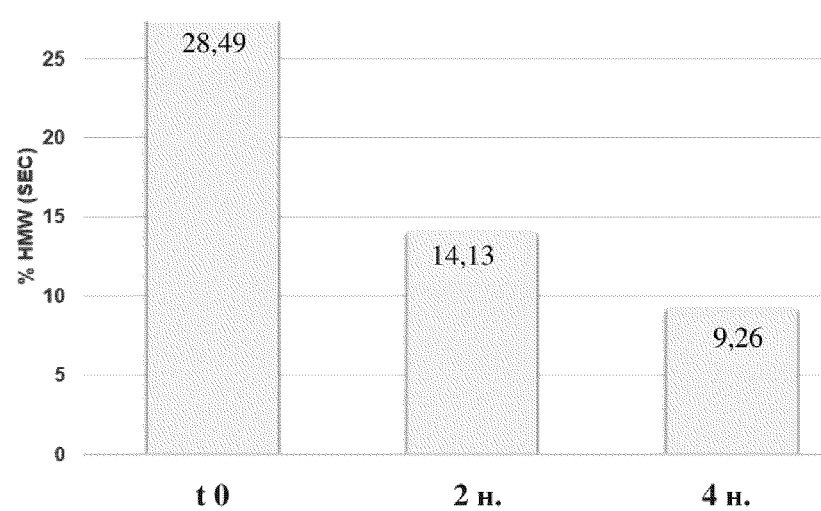
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе А, рН 4,9, 2-8°С



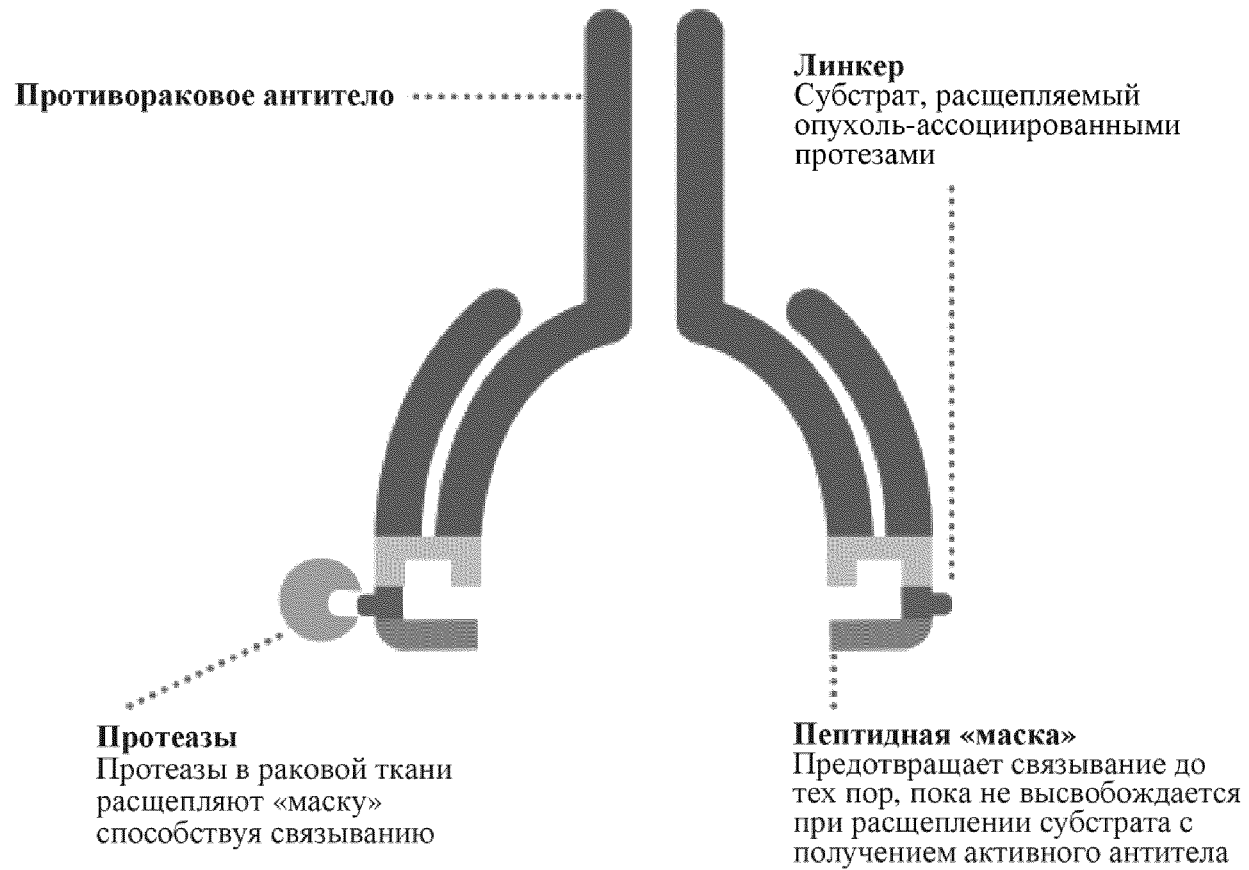
1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе А, рН 4,9, 25°С



1 мг/мл биспецифического маскированного антигенсвязывающего белка в составе А, рН 4,9, 25°С



**Фигура 11**



Фигура 12

