



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.11

(21) Номер заявки
201891694

(22) Дата подачи заявки
2017.01.25

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНСТРУКТЫ
БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

(31) 62/286,552

(32) 2016.01.25

(33) US

(43) 2019.01.31

(86) PCT/EP2017/051486

(87) WO 2017/129585 2017.08.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЮНИК) ГМБХ
(DE); ЭМДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Канапурам Секхар, Латипов Рамиль,
Тангарадж Балакумар (US), Помпе
Корнелиус (DE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) AIGNER M ET AL: "T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct", LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 27, no. 5, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 1107-1115, XP002735058, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/LEU.2012.341 [retrieved on 2012-11-26] abstract page 1108, right-hand col. figures

WO-A2-2015/036583

WO-A1-2004/106381

WO-A1-2013/072406

WO-A2-2016/004108

TIM SERNO ET AL: "Protein stabilization by cyclodextrins in the liquid and dried state", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 63, no. 13, 23 August 2011 (2011-08-23), pages 1086-1106, XP028320146, ISSN: 0169-409X, DOI:10.1016/

J.ADDR.2011.08.003 [retrieved on 2011-09-01] tables 2, 5, 6 page 1098, left-hand col. references 50, 174, 181

VAHID RAMEZANI ET AL: "A comparative study on the physicochemical and biological stability of IgG1 and monoclonal antibodies during spray drying process", DARU JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 22, no. 1, 18 March 2014 (2014-03-18), page 31, XP021184036, ISSN: 2008-2231, DOI:10.1186/2008-2231-22-31 abstract conclusion on page 6

HÄRTL ELISABETH ET AL: "Influence of hydroxypropyl-Beta-cyclodextrin on the stability of dilute and highly concentrated immunoglobulin formulations.", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES NOV 2013, vol. 102, no. 11, November 2013 (2013-11), pages 4121-4131, XP009193863, ISSN: 1520-6017 figures 1-3 page 4121, left-hand col., page 4130, right-hand col.

DATABASE WPI Week 200025 Thomson Scientific, London, GB; AN 2000-287738 XP002768676, & JP 2000 081435 A (WAKO PURE CHEM IND LTD) 21 March 2000 (2000-03-21) abstract

SERNO TIM ET AL: "Inhibition of agitation-induced aggregation of an IgG-antibody by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin.", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES MAR 2010, vol. 99, no. 3, March 2010 (2010-03), pages 1193-1206, XP009193913, ISSN: 1520-6017 abstract

BAEUEERLE PATRICK A ET AL: "Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy", CANCER RESEARCH, AACR, US PHILADELPHIA, PA, vol. 69, no. 12, 15 June 2009 (2009-06-15), pages 4941-4944, XP002665118, ISSN: 1538-7445, DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-0547 [retrieved on 2009-06-09] entire document, in particular abstract figure 1

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим конструктор биспецифического однопочечного антитела, связывающийся с антигеном на поверхности клетки мишени посредством первого связывающего домена и с поверхностным антигеном CD3 T-клеток посредством второго связывающего домена, β-циклодекстрин и буфер, где композиция является стабильной.

Уровень техники

Появление технологии рекомбинантной ДНК позволило разработать многие белковые фармацевтические препараты за последние три десятилетия. Фармацевтические препараты на основе белка в настоящее время входят в число наиболее быстрорастущих категорий терапевтических агентов в (до)клинических разработках и в качестве коммерческих продуктов. По сравнению с небольшими химическими фармацевтическими препаратами, белковые фармацевтические препараты обладают высокой специфичностью и активностью при относительно низких концентрациях и обычно обеспечивают терапию таких значительных заболеваний, как различные виды 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).

Благодаря успехам в процессах очистки в промышленном масштабе рекомбинантные белки теперь могут быть получены с высокой степенью чистоты при первом изготовлении. Однако белки только незначительно стабильны и очень восприимчивы к деградации, как химически, так и физически. Химическая деградация относится к модификациям, включающим ковалентные связи, такие как дезамидирование, окисление, расщепление или образование новых дисульфидных мостиков, гидролиз, изомеризация или дегликозилирование. Физическая деградация включает разворачивание белка, нежелательную адсорбцию на поверхности и агрегацию. Работа с этими физическими и химическими неустойчивостями является одной из самых сложных задач в развитии белковых фармацевтических препаратов (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul; 32(7):372-80).

Агрегация белка представляет собой крупное явление физической нестабильности белков и происходит из-за присущей тенденции минимизировать термодинамически неблагоприятное взаимодействие между растворителем и гидрофобными остатками белков. Это особенно проблематично, потому что оно встречается регулярно во время процессов рефолдинга, очистки, стерилизации, транспортировки и хранения. Агрегация может происходить даже в условиях раствора, где нативное состояние белка поддерживается высоко термодинамически благоприятной средой (например, нейтральной pH и 37°C) и отсутствием стрессов (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 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.).

Агрегация белков является проблематичной, поскольку она может ухудшить биологическую активность терапевтических белков. Более того, агрегация белков приводит к нежелательной органолептике лекарственного продукта и снижает выход продукта из-за сложных этапов очистки, которые необходимы для удаления агрегатов из конечного продукта. В последнее время также растет беспокойство и свидетельство того, что присутствие агрегированных белков (даже гуманизированных или полностью человеческих белков) может значительно увеличить риск того, что у пациента будет развиваться иммунный ответ на активный белковый мономер, что приведет к образованию нейтрализующих антител и лекарственной устойчивости или других неблагоприятных побочных эффектов (Mahler J Pharm Sci. 2009 Sep; 98(9):2909-34).

В литературе сообщалось о некоторых попытках минимизировать агрегацию белка различными механизмами. Белки могут быть стабилизированы и, таким образом, защищены от образования агрегатов и других химических изменений путем модификации их первичной структуры, тем самым увеличивая внутреннюю гидрофобность и уменьшая внешнюю гидрофобность. Однако генная инженерия белков может приводить к нарушению функциональности и/или повышенной иммуногенности. В другом подходе основное внимание уделяется диссоциации агрегатов (называемой "деагрегацией") для восстановления функциональных, нативных мономеров с использованием различных механизмов, таких как температура, давление, pH и соли. В настоящее время белковые агрегаты удаляются в виде осадка главным образом на этапах тонкой очистки последующей обработки. Однако в случае высоких уровней высокомолекулярного веса (ВММ), удаление значительного количества ВММ не только приводит к существенным потерям в выходе, но также делает сложной задачу создания надежного последующего процесса (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336).

Сохранение стабильности белка и активности в биологических и биотехнологических применениях создает серьезные проблемы. В данной области существует потребность в оптимизированных фармацевтических композициях, которые обеспечивают лучшую стабилизацию терапевтических белков и уменьшают агрегацию и денатурацию во время разработки, наполнения, доставки, хранения и введения, тем самым предотвращая потерю функции и неблагоприятные иммуногенные реакции. Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы удовлетворить потребность в этом.

Сущность изобретения

Нестабильность белка и, в частности, агрегация белка являются все более сложной проблемой в биотехнологической отрасли, где агрегация встречается на протяжении всего времени существования терапевтического белка, в том числе при рефолдинге, очистке, стерилизации, транспортировке и хранении. Таким образом, целью данного изобретения является создание стабильной фармацевтической композиции, содержащей конструктор биоспецифического одноцепочечного антитела, связывающийся с антигеном на поверхности целевой клетки через первый связывающий домен и с поверхностным антигеном CD3 Т-клеток через второй связывающий домен; β -циклодекстрин; и буфер.

β -циклодекстрин может присутствовать в выбранной группе, состоящей из β -циклодекстрина, метил- β -циклодекстрина, гидроксипропил- β -циклодекстрина, гидроксиэтил- β -циклодекстрина, этил- β -циклодекстрина, бутил- β -циклодекстрина, сукцинил-(2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина, гептакис(2,3,6-три-О-метил)- β -циклодекстрина, гептакис(2,3,6-три-О-бензоил)- β -циклодекстрина, натриевой соли β -циклодекстринфосфата, натриевой соли β -циклодекстринсульфата, триацетил- β -циклодекстрина, гептанатриевой соли гептакис (6-О-сульфо)- β -циклодекстрина, натриевой соли карбоксиметил- β -циклодекстрина, натриевой соли сульфобутилового эфира- β -циклодекстрина, 6-О- β -толуолсульфонил- β -циклодекстрина и, в частности, из натриевой соли сульфобутилового эфира- β -циклодекстрина, гидроксипропил- β -циклодекстрина. Он может присутствовать в концентрации от 0,1 до 20% (мас./об.), предпочтительно от 0,5 до 2% (мас./об.) и более предпочтительно от 0,8 до 1,5% (мас./об.).

Биспецифический одноцепочечный конструктор антитела может присутствовать в диапазоне концентраций 0,1-5 мг/мл, предпочтительно 0,2-2,5 мг/мл, более предпочтительно 0,25-1,0 мг/мл. Его первый связывающий домен может связываться с CD33. В частности, аминокислотную последовательность первого связывающего домена биспецифического одноцепочечного конструктора выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 99, 109, 119, 128, 137, 146, 155, 164 и 173 и аминокислотную последовательность второго связывающего домена биспецифического одноцепочечного конструктора выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 179 и 90.

Буфер может быть выбран из группы, состоящей из фосфата калия, уксусной кислоты/ацетата натрия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты/сукцината натрия, винной кислоты/тарtrate натрия, гистидина/гистидина HCl, глицина, трис, глутамата, ацетата и их смесей и, в частности, из фосфата калия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты, гистидина, глутамата, ацетата и их комбинаций.

Значение pH фармацевтической композиции может составлять от 4 до 7,5.

Один или несколько наполнителей могут присутствовать в предлагаемой в данном документе фармацевтической композиции, включая сахарозу, трегалозу, маннитол, сорбит, аргинин, лизин, полисорбат 20, полисорбат 80, полуксамер 188, плуроник и их комбинации.

Композиция может содержать один или несколько консервантов, в частности бензиловый спирт, хлорбутанол, фенол, метакрезол, метилпарабен, феноксиэтанол, пропилпарабен тиомеросал. Структура и типичная концентрация для использования этих консервантов описаны в табл. 1 у Meyer et al., J Pharm Sci. 96(12), 3155.

Также в данном документе представлена фармацевтическая композиция, свободная от консервантов, содержащая конструктор биспецифического одноцепочечного антитела, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или 110, и находящегося в концентрации около 0,5 мг/мл, и дополнительно циклодекстрин в виде натриевой соли сульфобутилового эфира- β -циклодекстрина в концентрации около 1% (мас./об.), и дополнительно буфер в виде фосфата калия в концентрации около 10 мМ, причем указанная композиция дополнительно содержит сахарозу в концентрации около 8% (мас./об.), и полисорбат 80 в концентрации около 0,01% (мас./об.) при pH около 6,0.

Описание графических материалов

Фиг. 1 - количественное определение высокомолекулярных соединений и конформера с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) в препаратах AMG 330 (SEQ ID NO: 100), содержащих полисорбат 20, 80 или HP- β -CD (гидроксипропил- β -циклодекстрин).

Фиг. 2 - влияние полисорбата (PS) 20, 80 и а HP- β -CD (гидроксипропил- β -циклодекстрина) на количество немономерных соединений (включая конформеры, димеры, агрегаты) в препаратах AMG 330 вследствие факторов стресса: не подвергавшийся стрессу (А), вспенивание (В) и 10 циклов замораживания/размораживания (С). Количественное определение соединений достигалось с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC). Концентрация белка определялась тем же анализом (детектирование А280).

Фиг. 3 - концентрационно-зависимый эффект HP- β -CD и SBE- β -CD (сульфобутилэфир β -циклодекстрина) на способность к агрегации (измеренный оптической плотностью при 350 нм, оптические плотности обозначают ход луча 10 мм) AMG 103 в присутствии 0,9% (об./об.) бензинового спирта.

Фиг. 4 - измерения интенсивности излучения собственной флуоресценции AMG 103 до (А) и после (В) инкубации при 37°C в течение 24 ч в присутствии 0,9% (об./об.) бензинового спирта.

Фиг. 5 - прогностические модели, полученные из экспериментальных проектов (2-уровневый полный 4-факторный эксперимент), описывающих эффект увеличения концентраций HP- β -CD (А) и SBE- β -CD (В) на оптическую плотность при 350 нм AMG 103 (SEQ ID NO: 174).

Фиг. 6 - оценка высокомолекулярных соединений (BMMC) с использованием эксклюзионной хроматографии в разных составах, содержащих 5 мг/мл CD33_2-hALB (SEQ ID NO: 175).

Фиг. 7 - скорость образования высокомолекулярных форм при 25 и 37°C для трех различных составов MSLN-hALB (SEQ ID NO: 176) (K60RTt (А), K60SBESuT (В) и K60RMSuT (С)), определяемая путем эксклюзионной хроматографии (SEC).

Фиг. 8 - формирование вариантов по заряду кислот при 25 и 37°C для трех различных составов

MSLN-hALB, определяемых слабой катионообменной ультравысокой жидкостной хроматографией (WCX-UPLC).

Фиг. 9 - растворимость AMG 330 при 40°C в присутствии 12% ПЭГ-3350. Как SBE-β-CD (Каптизол), так и Альгинат (Протанал) увеличивают растворимость агрегированного и мономерного AMG 330 при использовании в более высоких концентрациях. Однако SBE-β-CD преимущественно растворяет мономер. Контроль слева (1X PBS) инкубировали без SBE-β-CD, тогда как контроль справа (1X PBS) инкубировали без ПЭГ и SBE-β-CD.

Фиг. 10 - данные того же эксперимента, как изображено на фиг. 9, демонстрируют влияние различных концентраций SBE-β-CD и альгината на % мономеров и % агрегатов в AMG 330. SBE-β-CD при ~0,1-1% является эффективным при увеличении содержания мономера за счет агрегатов (показано зелеными стрелками). В отличие от этого, данные альгината показывают противоположную тенденцию к увеличению агрегатов (показано красной стрелкой). Было также показано, что SBE-β-CD снижает негативное влияние чрезмерной концентрации в этом случае.

Фиг. 11 - средняя относительная площадь пика AMG 330 в эксклюзионной хроматографии (SEC) после замены буфера и концентрирования белка посредством ультрафильтрации/центрифугирования.

Фиг. 12 - А: краткое описание максимальных концентраций AMG 330, достигаемых за счет чрезмерной концентрации, рассчитанной по главному пику SEC+BMM. Композиции SBE-β-CD (обозначенные звездочками) достигали более высоких концентраций и поддерживали более высокий % мономера. В: данные того же эксперимента, как показано на фиг. 12А, где AMG 330 был в концентрации до 7-8 мг/мл в присутствии возрастающих концентраций SBE-β-CD с глицином и сахарозой или без них (см. звездочки). Контроль слева концентрировали без SBE-β-CD. Контроль справа не концентрировали выше его начальной концентрации 0,4 мг/мл. Дополнительный образец, меченный как "2% глицин, 1% сахароза", концентрировали без SBE-β-CD, чтобы продемонстрировать преимущество использования SBE-β-CD. С: относительные площади пиков AMG 330 CEX после 5 дней инкубации при 4°C, среднее значение двух повторов. Все образцы содержат 20 мМ цитрата, 0,01% PS-80, pH 6,0. D: относительная площадь основного пика AMG 330 после анализа SEC. Все образцы также включают 20 мМ цитрата, 0,01% PS-80, pH 6,0.

Фиг. 13 - концентрация AMG 330, рассчитанная из главного пика SEC+BMM.

Фиг. 14 - относительная площадь пика AMG 330 в SEC после замены буфера и концентрации.

Фиг. 15 - суммированные площади пиков AMG 330 в SEC (главный пик+BMM) после инкубации с различными циклодекстринами.

Фиг. 16 - AMG 330 в 13 различных композициях при 1 мг/мл и хранением при -20, -30 и -70°C до 6 недель.

Фиг. 17 - А: хотя SBE-β-CD при 0,5% сам по себе может оказаться недостаточным для обеспечения обычного лиофилизированного осадка, он совместим с более распространенными наполнителями, такими как глицин и маннитол. Все эти лиофилизированные осадки хорошо растворялись и почти не вызывали агрегации или взвеси в присутствии SBE-β-CD. В: применение SBE-β-CD (синяя хроматограмма, обозначенная стрелкой), но не α-циклодекстрана (розовая хроматограмма, обозначенная стрелкой) уменьшает % агрегатов после растворения. Контрольная композиция без циклодекстрина (в густой черной линии) также показывает повышенный уровень агрегатов, хотя и ниже, чем α-циклодекстран. Эти результаты демонстрируют преимущество применения SBE-β-CD. С: аналитическая SEC различных композиций (до и после соответствует до лиофилизации и после разбавления). D: анализ MFI (режим микропотоковой визуализации) для различных композиций после лиофилизации.

Фиг. 18 - обобщенные результаты максимальных концентраций Fara BiTE® (SEQ ID NO: 177), достигаемых за счет избыточной концентрации. Композиции SBE-β-CD (обозначенные звездочками) достигали более высоких концентраций белка по сравнению с α-циклодекстраном и поддерживали более высокий % мономера. Композиции α-циклодекстрана утратили большую часть их растворимого белка из-за формирования осадка.

Фиг. 19 - общее описание процентного содержания высокомолекулярных соединений (BMMC), определяемых с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) с учетом композиции конструктора антитела CD33-scFc BiTE.

Фиг. 20 - общее описание процентного содержания высокомолекулярных соединений (BMMC), определяемых с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) с учетом композиции конструктора антитела FLT3-scFc BiTE.

Фиг. 21 - общее описание процентного содержания высокомолекулярных соединений (BMMC), определяемых с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) с учетом композиции конструктора антитела BCMA-scFc BiTE.

Подробное описание сущности изобретения

Несмотря на высокое качество современных терапевтических биотехнологических продуктов и сходство рекомбинантных человеческих белков и антител с эндогенными белками человека, белковая

нестабильность остается важной проблемой. Сообщалось, что помимо связанных с качеством последствий агрегации белков, таких как возможная потеря активности белка и нежелательная органолептика лекарственного продукта, растворимые агрегаты белка имеют значительные цитотоксические эффекты и, что важно, являются потенциальным фактором риска развития иммунного ответа на белковые продукты.

Агрегация белков может происходить в течение различных периодов жизни в течение всего жизненного цикла белка, включая ферментацию, рефолдинг, очистку, наполнение, транспорт, хранение или введение и сильно зависит от различных факторов окружающей среды. В данной области существует критическая потребность в повышении стабильности и уменьшении агрегации терапевтических белков; и оптимизированные фармацевтические составы могут помочь в этом. Авторы данного изобретения исследовали влияние различных циклодекстринов на агрегацию биспецифических конструкторов антител (в частности, биспецифического активатора Т-клеток, BiTE®) при воздействии различных факторов стресса окружающей среды. Неожиданным образом, но изобретатели обнаружили, что конструкторы антител могут быть значительно стабилизированы в присутствии циклодекстринов и, в частности, β -циклодекстринов.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает стабильную фармацевтическую композицию, включающую:

а) конструктор биспецифического одноцепочечного антитела, связывающегося с антигеном на поверхности целевой клетки через первый связывающий домен и с поверхностным антигеном CD3 Т-клеток через второй связывающий домен,

б) β -циклодекстрин и

с) буфер.

Стабильность.

В соответствии с данным изобретением термин "стабильность" или "стабилизация" относится к стабильности фармацевтической композиции в целом и, в частности, к стабильности активного вещества (т.е. конструктора биспецифического одноцепочечного антитела), особенно во время составления, наполнения, транспортировки, хранения и введения. Термины "стабильность" или "стабильная" в контексте фармацевтической композиции согласно изобретению и конструктора биспецифического одноцепочечного антитела, в частности, относятся к восстановлению или предотвращению образования белковых агрегатов (ВММС). В частности, термин "стабильность" также относится к коллоидной стабильности конструкторов биспецифических одноцепочечных антител, входящих в состав фармацевтической композиции, описанной в данном документе. "Коллоидная стабильность" представляет собой способность коллоидных частиц (таких как белки) оставаться диспергированными в жидкостях в течение длительного периода времени (от нескольких дней до нескольких лет).

Термин "(белковый) агрегат", как описано в данном документе, обычно охватывает белковые виды с более высокой молекулярной массой, такие как "олигомеры" или "мультимеры", вместо желаемых определенных соединений (например, мономера). Этот термин используется в данном документе взаимозаменяемо с терминами "высокомолекулярные соединения" и "ВММС". Агрегаты белков обычно могут различаться по размеру (от малых (димеров) до крупных агрегатов (не видимых невооруженным глазом или даже видимых частиц) и в пределах нанометра до микрометра в диаметре), морфологии (приблизительно от сферической до фибриллярной), структуре белка (нативная по сравнению с денатурированной), типу межмолекулярного связывания (ковалентный или нековалентный), обратимости и растворимости. Растворимые агрегаты охватывают размеры в диапазоне примерно от 1 до 100 нм, а белковые частицы охватывают не видимые невооруженным глазом (~0,1-100 мкм) и видимые (>100 м) в диапазоне. Все вышеупомянутые типы белковых агрегатов обычно описываются термином. Термин "(белковый) агрегат", таким образом, относится ко всем видам физически связанным или химически связанным не природным соединениям двух или более белковых мономеров.

Таким образом, термин "агрегация белка" или "не природная агрегация" означает процесс(ы), посредством которого белковые молекулы собираются в комплексы, состоящие из двух или более белков, с отдельными белками, обозначенными как мономер. Существует несколько путей, приводящих к агрегации белков, которые могут быть вызваны широким спектром условий, включая температуру, механическое напряжение, такое как встряхивание и перемешивание, резким изменениям давления, замораживанием и/или размораживанием и процессом изготовления композиции.

Температура.

Повышение температуры ускоряет химические реакции, такие как окисление и дезамидирование белков, что, в свою очередь, может способствовать агрегации. Более высокая температура также непосредственно влияет на конформацию белков на четвертичном, третичном и вторичном уровнях структуры и может приводить к индуцированному температурой разворачиванию, которое может способствовать агрегации.

Замораживание и размораживание.

Денатурация и агрегация белка могут возникать во время замораживания/размораживания из-за сложных физических и химических изменений, таких как создание новых границ разделов лед/раствор,

адсорбции на поверхности контейнеров, криоконцентрации белка и растворенных веществ и изменения pH из-за кристаллизации буферных компонентов.

Концентрация белка.

Увеличение концентрации белка может также усиливать образование белковых агрегатов. При высоких концентрациях белка происходит фазовое исключение, термин, используемый для описания влияния высокого суммарного количества заполнения макромолекулярными растворенными компонентами на поведение каждого макромолекулярного соединения в этом растворе. В соответствии с этой теорией исключенных количеств, может поддерживаться самосборка и, следовательно, потенциальная агрегация.

Консерванты.

Антимикробные консерванты, такие как бензиловый спирт и фенол, часто необходимы в белковых жидких композициях, для обеспечения стерильности в течение срока годности и, кроме того, необходимы в многодозовых препаратах и некоторых системах доставки лекарств, например в шприц-ручках, в мини-помпах и местном применении. Сообщалось, что многие консерванты индуцируют агрегацию белка, хотя основной механизм недостаточно изучен. Было высказано предположение, что консерванты связывают и наполняют белки в развернутом состоянии, которые склонны к агрегации.

Предпочтительно, чтобы фармацевтические композиции по данному изобретению считались стабильными, т.е. оставались свободными или по существу свободными от белковых агрегатов даже при воздействии стресса, в частности теплового стресса, хранения, поверхностно-индуцированных стрессов (например, циклов замораживания/размораживания, вспенивания), концентрирования (путем ультра- и диафильтрации) или смешивания с органическими соединениями, такими как антимикробные консерванты.

Предпочтительно фармацевтические композиции могут иметь сходные или даже улучшенные характеристики по сравнению с композициями, содержащими SBE- β -CD или HP β -CD, которые были оценены в прилагаемых примерах. Фармацевтические композиции по изобретению предпочтительно представляют собой гомогенные растворы диспергированных конструкторов мономерных биспецифических одноцепочечных антител.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что, хотя фармацевтическая композиция эффективно обеспечивает стабилизацию активного вещества (т.е. уменьшает или ингибирует образование белковых агрегатов конструктора биспецифического одноцепочечного антитела), иногда могут образовываться некоторые агрегаты или конформеры, однако без существенного риска общего использования фармацевтической композиции. В этом контексте "существенно свободные" от агрегатов означают, что количество агрегатов остается ниже 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% (мас./об.), в частности, также при воздействии стрессовых факторов окружающей среды, например как оценивается в прилагаемых примерах.

Способы определения присутствия растворимых и нерастворимых агрегатов белка были, среди прочего, рассмотрены Mahler et al., J Pharm Sci. 2009 Sep; 98(9):2909-34. Формирование растворимых белковых агрегатов можно оценить с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC), как описано в прилагаемых примерах. SEC (эксклюзионная хроматография) является одним из наиболее используемых аналитических способов для детектирования и количественного определения белковых агрегатов. Анализ SEC позволяет установить и размеры агрегатов, и их количество. SEC-UPLC позволяет проводить селективное и быстрое разделение макромолекул по их форме и размеру (гидродинамический радиус) в диапазоне молекулярных масс около 5-1000 кДа.

Растворы белка проявляют оптическое свойство, называемое опалесценцией или мутностью. Оптическое свойство раствора представляет собой действие частиц, присутствующих для рассеивания и поглощения света. Белки представляют собой природные коллоиды, а мутность водных композиций зависит от концентрации белка, наличия нерастворенных частиц, размера частиц и количества частиц на единицу объема. Мутность может быть измерена с помощью оптической спектроскопии в виде оптической плотности в диапазоне 340-360 нм и использована для обнаружения как растворимых, так и нерастворимых агрегатов.

Более того, проверка образцов визуальными средствами по-прежнему является важным аспектом оценки белковых агрегатов. Визуальная оценка отсутствия или наличия видимых агрегатов предпочтительно выполняется в соответствии с 5-м тестом Немецкого кодекса лекарственных средств (DAB).

Как указано в другой части данного документа, предполагается, что фармацевтическая композиция по изобретению, скорее всего, под действием β -циклодекстринов, содержащихся в ней, способствует повышенной коллоидной стабильности конструкторов биспецифических одноцепочечных антител и, следовательно, демонстрирует уменьшенное или даже отсутствующее разделение фаз на границе жидкость-жидкость (LLPS). LLPS является термодинамически обусловленным событием, в котором гомогенный белковый раствор разделяется на фазу, обедненную белком (обычно верхний слой) и фазу, обогащенную белком (обычно нижний слой) с понижением температуры. LLPS обычно полностью обратима, просто путем смешивания двух фаз и повышения температуры раствора. Возникновение LLPS относится к близкодистанционным аттрактивным белково-белковыми взаимодействиями, что делает его мерой прочности белково-белковой аттракции. Обнаружено, что фармацевтические композиции, содержащие β -циклодекстрины в соответствии с изобретением, содержат более высокие концентрации конструкторов

биспецифических одноцепочечных антител в LLPS фазе, обедненной белком, по сравнению с фармацевтическими композициями, не содержащими β -циклодекстринов. Соответственно, фармацевтические композиции по изобретению предусматривают проявление сниженной LLPS или отсутствие LLPS вообще, по сравнению с контролем и, таким образом, способствуют повышению коллоидной стабильности конструкторов биспецифических одноцепочечных антител по данному изобретению. LLPS можно индуцировать, и содержание белка в разных фазах можно исследовать, как описано в прилагаемых примерах.

Стрессовый фактор окружающей среды, в частности, посредством термической и/или химической денатурации, также приводит к конформационным изменениям, которые, в свою очередь, могут способствовать агрегации. Неожиданным образом, авторы данного изобретения обнаружили, что конструкторы биспецифических одноцепочечных антител также стабилизируются в соответствии с конформационными изменениями, которые оцениваются путем измерения интенсивности излучения собственной флуоресценции ароматических аминокислот. Таким образом, фармацевтическая композиция по данному изобретению предпочтительно также уменьшает или ингибирует образование конформеров (т.е. не природных, аномально свернутых белковых молекул).

Конструктор антитела.

Как объяснялось ранее, стабильная фармацевтическая композиция по данному изобретению содержит конструктор биспецифического одноцепочечного антитела, связывающийся с антигеном на поверхности целевой клетки через первый связывающий домен и с поверхностным антигеном CD3 T-клеток через второй связывающий домен.

Термин "конструктор антитела" обычно относится к молекуле, в которой структура и/или функция(ии) основана(ы) на структуре и/или функции антитела, например полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина. Таким образом, конструктор антитела способен связываться со своей специфической мишенью или антигеном. Кроме того, конструктор антитела в соответствии с изобретением содержит минимальные структурные требования к антителу, которые позволяют целевое связывание. Это минимальное требование может, например, определяться присутствием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). Антитела, на которых основаны, описанные в данном документе конструкторы, включают, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

В определении "конструкторы антител" представлены полноразмерные или целые антитела, включая антитела верблюдовых и другие иммуноглобулиновые антитела, полученные способами или процессами биотехнологической или белковой инженерии. Эти полноразмерные антитела могут представлять собой, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела. Также в определении "конструкторы антител" представлены фрагменты полноразмерных антител, таких как VH, V_HH, VL, (s) dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ или "r IgG", ("полуантитело"). Конструкторы антител также могут быть модифицированными фрагментами антител, также называемыми вариантами антител, такими как scFv, di-scFv или bi (s)-scFv, scFv-Fc, scFv-молния, scFab, Fab₂, Fab₃, диатела, одноцепочечные антитела, tandemные диатела (Tandab's), tandemные di-scFv, tandemные tri-scFv, "миниантитела", со структурой в качестве примера, которая выглядит следующим образом: (VH-VL-CH₃)₂, (scFv-CH₃)₂ или (scFv-CH₃-scFv)₂, мультиантитела, такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как наноантитела или антитела с одним варибельным доменом, содержащие только один варибельный домен, которым могут быть V_HH, V_{NAR} VH или VL, которые специфически связывают антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов. Также термин "конструктор антитела" включает конструкторы однодоменных антител, состоящие из (по меньшей мере) двух моноклональных однодоменных антител, которые индивидуально выбирают из группы, включающей VH, VL, V_HH и V_{NAR}, и линкер. Линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера. Аналогично, "scFv-однодоменное мкАТ" представляет собой конструктор моноклонального антитела, состоящий по меньшей мере из одного однодоменного антитела, как описано выше, и одной молекулы scFv, как описано выше. Опять же, линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера.

Кроме того, определение термина "конструкторы антител" обычно включает моновалентные, бивалентные и поливалентные/мультивалентные конструкторы и, таким образом, моноспецифические конструкторы, специфически связываются только с одной антигенной структурой, а также биспецифические и полиспецифические/мультиспецифические конструкторы, которые специфически связывают больше чем одну антигенную структуру, например две, три или более, через различные связывающие домены. Более того, определение термина "конструкторы антител" включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы, состоящие из более чем одной полипептидной цепи, при этом цепи могут быть либо идентичными (гомодимеры, гомотриммеры, или гомогенные олигомеры), либо различными (гетеродимер, гетеротриммер или гетероолигомер). В контексте данного изобретения особенно предпочтительными являются конструкторы биспецифических одноцепочечных антител, связывающиеся с антигеном на поверхности целевой клетки через первый связывающий домен и с поверхностным антигеном CD3 T-клеток через второй связывающий домен.

Связывающие домены.

Термин "связывающий домен" характеризует домен, который (специфически) связывается/взаимодействует с/распознает данный целевой эпитоп или данный целевой сайт на целевых молекулах (антигенах). Связывающие домены предпочтительно находятся в форме полипептидов. Такие полипептиды могут включать белковые части и небелковые части (например, химические линкеры или химические сшивающие агенты, такие как глутаровый альдегид). Белки (включая их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты и пептиды, обычно имеющие менее 30 аминокислот) содержат две или более аминокислоты, связанные друг с другом посредством ковалентной пептидной связи (приводящей к цепи аминокислот). Используемый в данном документе термин "полипептид" описывает группу молекул, которые обычно состоят более чем из 30 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и большие олигомеры, т.е. состоящие более чем из одной молекулы полипептида. Молекулы полипептидов, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или не идентичными. Соответствующие структуры более высокого порядка таких мультимеров, следовательно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая в своей естественной форме состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к естественно модифицированным пептидам/полипептидам/белкам, где модификация осуществляется, например, посттрансляционными модификациями, такими как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. "Пептид", "полипептид" или "белок", указанный в данном документе, также может быть химически модифицирован, например, пегилированием. Такие модификации хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе ниже.

Структура и функция первого связывающего домена и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена основана на структуре и/или функции антитела, например полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина. Первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи (VL)) и трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH)). Второй связывающий домен предпочтительно также содержит минимум структурных требований к антителу, которое позволяет целевое связывание. Более предпочтительно второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL области) и/или три CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH области).

Как упоминалось выше, связывающий домен может, как правило, содержать варибельную область легкой цепи (VL) антитела и варибельную область тяжелой цепи (VH) антитела; однако он не должен содержать обе. Fd-фрагменты, например, имеют две области VH и часто сохраняют некоторую антигенсвязывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена. Примеры (модифицированных) антигенсвязывающих фрагментов антитела включают:

- (1) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, имеющий VL, VH, CL и CH1-домены;
- (2) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, имеющий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области;
- (3) Fd-фрагмент, имеющий два домена VH и CH1;
- (4) Fv-фрагмент, имеющий домены VL и VH одного плеча антитела;
- (5) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), который имеет домен VH;
- (6) изолированную область, определяющую комплементарность (CDR); и
- (7) единственную цепь Fv (scFv).

Варибельные области.

Термин "варибельный" относится к частям антител или доменов иммуноглобулина, которые проявляют варибельность их последовательности и которые участвуют в определении специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е. "варибельного домена(ов)"). Объединение варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи (VL) вместе образует один антигенсвязывающий сайт. Домен CH, наиболее близкий к VH, обозначается как CH1. Каждая легкая (L) цепь связана с тяжелой (H) цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи.

Варибельность распределяется неравномерно по всем варибельным доменам антител; она сосредоточена в субдоменах каждой из варибельных областей тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гиперварибельными областями" или "областями, определяющими комплементарность" (CDR). CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфические взаимодействия антитела с антигеном и, следовательно, способствуют функциональной активности молекулы антитела: они являются основными детерминантами антигенной специфичности.

Конкретные определенные границы и длины CDR представляют собой предмет для разных систем классификации и нумерации. Поэтому CDR могут указываться по Rabat, Chothia, контактам или любым другим определенным границам, включая описанную в данном документе систему нумерации. Несмотря на разные границы, каждая из этих систем имеет некоторую степень совпадения в том, что составляет

так называемые "гипервариабельные области" в пределах вариабельных последовательностей. Таким образом, определения CDR в соответствии с этими системами могут различаться по длине и граничным областям относительно смежной каркасной области. См., например, Rabat (an approach based on cross-species sequence variability), Chothia (an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes) и/или MacCallum (Rabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196: 901-917; и MacCallum et al., J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики сайта связывания антигена является определение AbM, используемое программным обеспечением для моделирования антител AbM Oxford Molecular. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Rontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В той мере, в которой два метода идентификации остатков определяют области совпадения, но не идентичные области, их можно объединить для определения гибридной CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Кабата является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которая принимается контурами связывания антигена (CDR). Из сравнительных структурных исследований было установлено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный набор доступных конформаций. Каждая каноническая структура может быть охарактеризована торсионными углами полипептидного остова. Таким образом, соответствующие петли между антителами могут иметь очень похожие трехмерные структуры, несмотря на высокую вариабельность аминокислотной последовательности в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia et al., Nature, 1989, 342: 877; Martin и Thornton, J. Mol. Biol, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между принятой структурой петли и ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в пределах консервативного каркасного участка (т.е. вне петли). Таким образом, назначение конкретного канонического класса может быть основано на наличии этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать принцип такой как линейная последовательность антитела, например, как каталогизировано по Кабату (Rabat et al., loc. cit.). Схема (система) нумерации по Кабату является широко принятым стандартом для нумерации аминокислотных остатков вариабельного домена антитела определенным образом и является предпочтительной схемой, применяемой в данном изобретении, так и других упомянутых частях данного документа. Дополнительные структурные аспекты также могут быть использованы для определения канонической структуры антитела. Например, эти различия, не полностью отраженные нумерацией по Кабату, могут быть описаны системой нумерации Чотия и др. и/или выявлены другими методами, например кристаллографией и двумерным или трехмерным вычислительным моделированием. Соответственно, данная последовательность антител может быть помещена в канонический класс, который позволяет, среди прочего, идентифицировать соответствующие последовательности каркаса (например, исходя из желания включить в библиотечку множество канонических структур). Нумерация по Кабату аминокислотных последовательностей антител и структурные аспекты, как описано Chothia et al., loc. cit. и их последствия для толкования канонических аспектов структуры антител описаны в литературе. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области техники. Обзор структуры антител см. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и, в частности, CDR3 тяжелой цепи может составлять наиболее важные детерминанты связывания антигена в вариабельных областях легкой и тяжелой цепи. В некоторых конструктах антител CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, составляет основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, в которых варьируют только CDR3, могут быть использованы для изменения связывающих свойств антитела или определения того, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является самым большим источником молекулярного разнообразия в сайте, связывающим антитело. H3, например, может представлять собой всего два аминокислотных остатка или быть больше чем 26 аминокислот.

Каркасные и константные области.

Более консервативные (т.е. не гипервариабельные) части вариабельных доменов называются "каркасными" областями (FRM) и обеспечивают основу для шести CDR в трехмерном пространстве для образования антигенсвязывающей поверхности. Вариабельные домены, встречающихся в природе тяжелых и легких цепей, содержат четыре FRM-области (FR1, FR2, FR3 и FR4), в основном с принимаемой β -складчатой конфигурацией, соединенные тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях образующие часть структуры β -складчатости.

Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от FRM и, с гипервариабельными областями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта (см. Rabat et al., loc. cit.). Константные домены непосредственно не вовлечены в связыва-

ние антигена, но проявляют различные эффекторные функции, такие как, например, зависимость от антител, клеточно-опосредованная цитотоксичность и активация комплемента.

Специфичность связывания.

Конструкты биспецифических антител.

Как объяснялось ранее, конструкт антитела, содержащийся в фармацевтической композиции по изобретению, в частности, рассматривается как конструкт биспецифического одноцепочечного антитела. Используемый в данном документе термин "биспецифический" относится к конструкту антитела, который является "по меньшей мере биспецифическим", т.е. он содержит, по меньшей мере, первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью, и второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью. Соответственно, конструкты антител, описываемые термином, включают специфичность по меньшей мере для двух разных антигенов или мишеней. Термин "конструкт биспецифического антитела", таким образом, также включает конструкты мультиспецифических антител, такие как триспецифические конструкты антител, последние из которых включают три связывающих домена или конструкта, имеющих более трех (например, четыре, пять, ...) специфичностей. Учитывая, что конструкты антител (по крайней мере) биспецифичны, они не встречаются в природе, и они заметно отличаются от природных продуктов. Таким образом, конструкт "биспецифического" антитела является искусственным гибридным антителом или иммуноглобулином, имеющим по меньшей мере два различных сайта связывания с различными специфичностями. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, например, путем химической конъюгации двух различных очищенных моноклональных антител (мкАТ) или фрагментов антител или путем слияния двух гибридом, приводящих к клеточной линии квадромы, продуцирующей, в частности, биспецифические молекулы IgG (см. Kontermann and Brinkmann, *Drug Discov Today*. 2015 Jul;20(7):838-47 for review).

Мишени.

Как указывалось ранее, фармацевтическая композиция по данному изобретению содержит конструкт биспецифического одноцепочечного антитела, связывающийся с антигеном на поверхности целевой клетки через первый связывающий домен и с поверхностным антигеном CD3 T-клеток через второй связывающий домен.

Термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "(специфически), направлен на" и "(специфически) реагирует с", в соответствии с данным изобретением, означают, что связывающий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с одним или более предпочтительно по меньшей мере с двумя, более предпочтительно по меньшей мере с тремя, и наиболее предпочтительно по меньшей мере с четырьмя аминокислотами эпитопа, расположенного на целевом белке или антигене.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается связывающий домен, такой как антитело или иммуноглобулин или производное или фрагмент антитела или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным, и поэтому термин эпитоп иногда также упоминается в данном документе как "антигенная структура" или "антигенная детерминанта". Таким образом, связывающий домен является "сайтом взаимодействия с антигеном". Указанное связывание/взаимодействие также понимается как "специфическое распознавание". "Эпитопы" могут образовываться как смежными аминокислотами (линейный эпитоп), так и несмежными аминокислотами, связанными с третичным фолдингом белка (конформационный эпитоп). Линейные эпитопы обычно включают по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 и, более обычно, по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например, от 8 до 10 аминокислот в уникальной последовательности. Конформационный эпитоп обычно содержит увеличенное количество аминокислот относительно линейного эпитопа. Методы определения конформации эпитопов включают, но не ограничиваются ими, рентгеновскую кристаллографию, двумерную ядерную магнитно-резонансную спектроскопию (2D-ЯМР) и сайт-направленное спиновое мечение, и электронную парамагнитную резонансную (ЭПР) спектроскопию.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или эпитопным кластером подразумевает, что связывающий домен проявляет заметное сродство к эпитопу или эпитопному кластеру на конкретном белке или антигене и, как правило, не обладает значительной реакционной способностью с белками или антигенами, не являющимися мишенями. "Заметное сродство" включает связывание с аффинностью около 10^{-6} М (KD) или более сильное. Предпочтительно, связывание считается специфическим, когда аффинность составляет от 10^{-12} до 10^{-8} М, от 10^{-12} до 10^{-9} М, от 10^{-12} до 10^{-10} М, от 10^{-11} до 10^{-8} М, предпочтительно от 10^{-11} до 10^{-9} М. Предпочтительно связывающий домен по изобретению не существенно или в основном не связывается с белками или антигенами, отличными от его белков-мишеней или антигенов (т.е. первый связывающий и второй связывающий домен не способны связываться к белками, отличными от их целевого белка).

Термин "не существенно/в основном не связывается" или "не способен связываться" означает, что связывающий домен по данному изобретению не связывает белок или антиген, отличный от его целевого белка или антигена, т.е. не проявляет реактивности более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% с белками или ан-

тигенами, отличными от его целевого белка или антигена, посредством чего связывание с его соответствующим целевым белком или антигеном устанавливается равным 100%.

Как поясняется в данном документе, предполагается, что конструктор биспецифического одноцепочечного антитела рассматривается как содержащий первый связывающий домен, способный связываться с целевым антигенным поверхностью клетки и второй связывающий доменом, способным связываться с поверхностным антигеном CD3 Т-клеток. Конструктор антитела, связывающие домены и, в частности, второй связывающий домен (который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки), в частности, рассматривается, как имеющий следующий вид: пара VH-областей и VL-областей находятся в виде одноцепочечного антитела (scFv). Области VH и VL расположены в порядке VH-VL или VL-VH. Предпочтительно, чтобы VH-область располагалась на N-конце относительно линкерной последовательности, а VL-область располагалась на C-конце линкерной последовательности.

Второй связывающий домен конструктора антитела, входящий в состав фармацевтической композиции по изобретению, способен связываться с поверхностным антигеном CD3 Т-клетки. Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов (сам по себе тип лейкоцитов), которые играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Существует несколько подмножеств Т-клеток, каждая из которых имеет определенную функцию. Т-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как В-клетки и NK-клетки, по наличию Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), и состоит из двух различных белковых цепей. В 95% Т-клеток, TCR состоит из альфа (α) и бета (β) цепи. Когда TCR взаимодействует с антигенным пептидом и МНС (комплекс пептид/МНС), Т-лимфоцит активируется посредством ряда биохимических событий, опосредуемых связанными ферментами, корецепторами, специализированными адаптивными молекулами и активированными или высвобождаемыми транскрипционными факторами.

CD3-рецепторный комплекс представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 γ (гамма), цепь CD3 δ (дельта) и две цепи CD3 ϵ (эпсилон). Эти цепи связываются с Т-клеточным рецептором (TCR) и так называемой ζ , (дзета) цепью с образованием комплекса CD3-рецептора Т-клеток и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Цепи CD3 γ (гамма), CD3 δ (дельта) и CD3 ϵ (эпсилон) представляют собой высокородственные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулина, содержащего один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина, или ITAM для краткости, который необходим для сигнальной способности TCR. Молекула CD3-эпсилон представляет собой полипептид, который у человека кодируется геном CD3E, который находится на хромосоме 11.

Второй связывающий домен конструктора биспецифического одноцепочечного антитела, входящий в состав фармацевтической композиции по изобретению, способен связываться с антигеном на поверхности целевой клетки. Указанный антиген целевой клеточной поверхности может вообще быть любым антигеном, который может быть распознан и связан со вторым связывающим доменом. Предполагается, что конструктор биспецифического одноцепочечного антитела образует связь между Т-клетками и целевыми клетками путем связывания с CD3 и антигеном клеточной поверхности. Таким образом, считается, что конструктор биспецифического одноцепочечного антитела мобилизует Т-клетки к целевым клеткам и предпочтительно приводит Т-клетки к проявлению цитотоксической активности на целевых клетках путем продуцирования проапоптотических белков, таких как перфорин и гранзимы, тем самым влияя на целевую клетку. Таким образом, целевая клетка будет, как правило, клеткой, предназначенной в качестве цели для опосредованной Т-клеточной цитотоксичности и, следовательно, цитолиза. Например, целевая клетка может быть опухолевой клеткой, такой как злокачественная бластная клетка. Таким образом, поверхностный антиген целевой клетки может быть выбран из CD33, CD19, FAPalpha, MSLN, FLT3 или BCMA. CD33 конкретно рассматривается как цель для первого связывающего домена конструктора биспецифического одноцепочечного антитела по изобретению.

Предпочтительные конструкторы биспецифических одноцепочечных антител по данному изобретению включают AMG 103 (содержащий первый распознающий CD19 связывающий домен), AMG 330 (содержащий первую связывающую область, распознающую CD33), CD33-специфичный HLE BiTE, FLT3-специфичный HLE BiTE и BCMA-специфичный HLE BiTE, как оценивается в прилагаемых примерах.

В частности, аминокислотную последовательность первого связывающего домена биспецифического одноцепочечного конструктора выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 99, 109, 119, 128, 137, 146, 155, 164, 173, 183, 185 и 187 и аминокислотную последовательность второго связывающего домена биспецифического одноцепочечного конструктора выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 179 и 90.

Предпочтительные конструкторы биспецифических одноцепочечных антител по изобретению, таким образом, включают конструкторы, содержащие или состоящие из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 100, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188.

Пептидные линкеры.

По меньшей мере два связывающих домена и переменные домены конструктора антитела по данному изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" определяет, в соответствии с данным изобретением, аминокислотную последовательность, посредством которой аминокислотные последовательности одного (переменного и/или связывающего) домена и другого (переменного и/или связывающего) домена конструктора антитела по изобретению связаны друг с другом. Существенной технической особенностью такого пептидного линкера является то, что указанный пептидный линкер не содержит никакой активности полимеризации. Среди подходящих пептидных линкеров, так описаны в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344.

В таком случае, если используется линкер, этот линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточные для обеспечения того, чтобы каждый из первого и второго доменов мог независимо друг от друга сохранять свои различные специфичности связывания. Для пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена в конструкторе антитела (или два переменных домена), эти пептидные линкеры могут содержать только несколько аминокислотных остатков, например 12 аминокислотных остатков или менее, таких как 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Предполагаемый пептидный линкер с менее чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту (аминокислоты) и может быть обогащенным глицином, т.е. может состоять из одной аминокислоты глицина. Другой полезный пептидный линкер характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 178), т.е. Gly₄Ser, или их полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число 1 или больше. Предпочтительно пептидные линкеры не способствуют образованию каких-либо вторичных структур. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкторов и их экспрессии в клетках млекопитающих или бактериях, хорошо известны в данной области техники (например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012).

Производные.

Термин "конструктор антитела" также включает производные. Термин "производное" обычно относится к конструктору антитела, который ковалентно модифицирован для установления дополнительной функциональности. Ковалентные модификации конструкторов антител могут быть введены после трансляции путем взаимодействия специфических аминокислотных остатков молекулы с органическим дериватизирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками. Дериватизацию конструкторов антител можно использовать для прикрепления терапевтических или диагностических агентов, меток, групп, продлевающих период полувыведения в сыворотке молекулы или введения неприродных аминокислот. Обычно применяемые химические модификации включают следующее:

Остатки цистеинила чаще всего подвергают взаимодействию с α-галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Остатки цистеинила также дериватизируют реакцией с бромтрифторацетоном, α-бром-β-(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлормеркурибензоатом, 2-хлормеркури-4-нитрофенола или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазола.

Гистидильные остатки дериватизируют реакцией с диэтилпироксидом при pH 5,5-7,0, поскольку этот агент относительно специфичен для гистидильной боковой цепи. Пара-бромфенацилбромид также полезен; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М ацетате натрия при pH 6,0. Лизинил и аминоконцевые остатки реагируют с янтарными или другими ангидридами карбоновой кислоты. Получение производных с этими агентами приводит к изменению заряда лизиновых остатков. Другие подходящие реагенты для дериватизации α-аминосодержащих остатков включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимид; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлороборогидрат; тринитробензолсульфокислота; O-метилизомочевина; 2,4-пентандион; и трансаминаз-катализируемую реакцию с глиоксалью.

Остатки аргинила модифицируют реакцией с одним или несколькими обычными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-дихлоргександион и нингидрин. Для получения производных на остатках аргинина требуется, чтобы реакция проводилась в щелочных условиях из-за высокой pK_a гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также с аргинин-ε-аминогруппой.

Конкретную модификацию тирозильных остатков можно получить, в частности, применяя введение спектральных меток в тирозильные остатки путем взаимодействия с ароматическими соединениями диазотирования или тетранитрометаном. Чаще всего N-ацетилимидозол и тетранитрометан используют для образования O-ацетил-тирозильных соединений и 3-нитропроизводных, соответственно. Тирозильные остатки йодируют с использованием ¹²⁵I или ¹³¹I для получения меченых белков для использования в радиоиммунологическом анализе, описанный выше хлораминовый способ является подходящим.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) селективно модифицируют реакцией с

карбодиимидами ($R'-N=C=N-R'$), где R и R' являются необязательно различными алкильными группами, такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил) карбодиимид. Кроме того, остатки аспаргила и глутамила превращают в остатки аспарагина и глутаминила реакцией с ионами аммония.

Получение производных с помощью бифункциональных агентов полезна для сшивания конструкторов антител по данному изобретению с водо-нерастворимым поддерживающим матриксом или поверхностью для использования в различных способах. Широко используемые сшивающие агенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, эфиры N-гидроксисукцинимиды, например сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дителиобис(сукцинимидилпропионат) и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватизирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио] пропионидат, дают фотоактивируемые промежуточные продукты, которые способны образовывать сшивки в присутствии света. В альтернативном варианте, реакционноспособные водо-нерастворимые матрицы, такие как активированные цианогенбромидом углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патенте США № 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537; и 4330440, используемые для иммобилизации белка.

Остатки глутаминила и аспарагинила часто дезамидируют, соответственно, в остатки глутамила и аспаргила. В альтернативном варианте, эти остатки дезамидируют в слабокислых условиях. Любая форма этих остатков входит в объем данного изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериновых или треонильных остатков, метилирование α-аминогрупп лизиновых, аргининовых и гистидиновых боковых цепей (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Гликозилирование и дегликозилирование.

Другой тип ковалентной модификации конструкторов антител, включенных в объем данного изобретения, включает изменение характера гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, характер гликозилирования может зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия отдельных аминокислотных остатков гликозилирования, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в котором образуется белок. Конкретные системы экспрессии рассмотрены ниже.

Гликозилирование полипептидов обычно либо является N-связанным, либо O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из Сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбоксильной кислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление сайтов гликозилирования к конструктору антитела обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение может также быть сделано путем добавления или замещения одним или несколькими остатками серина или треонина в исходную последовательность (для сайтов, O-связанного гликозилирования). Для удобства, аминокислотная последовательность конструктора антитела предпочтительно изменяется с помощью изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутации ДНК, кодирующей полипептид, на заранее выбранных основаниях, так что генерируются кодоны, которые будут транслироваться в нужные аминокислоты.

Другим способом увеличения количества углеводных фрагментов в конструкторе антител является химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. Эти процедуры выгодны тем, что они не требуют продукции белка в клетке-хозяине, которая обладает способностью гликозилирования для N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого вида связи, сахар(а) могут быть присоединены к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как цистеин, (d) свободным гидроксильным группам, таким как серин, треонин или гидроксипролин, (e) ароматические остатки, такие как фенилаланин, тирозин или триптофан, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, и в Aplin и Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходном конструкторе антитела, может быть осуществлено химически или ферментативно. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к расщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением связывающего сахара (N-

ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя полипептид неповрежденным.

Chemical deglycosylation is described by Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 and by Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на полипептидах может быть достигнуто за счет использования множества эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено с помощью соединения туникамицина, как описано Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование белково-N-гликозидных связей.

Небелковые полимеры.

В данном документе рассматриваются другие модификации конструктора антитела. Например, другой тип ковалентной модификации конструктора антитела включает связывание конструктора антитела с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь ими, различные полиолы, такие как различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль (пегилирование), полипропиленгликоль, полиоксикалены, или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля или углеводов, такие как гидроксипропилацетат (например, HESylation®) или полисиаловая кислота (например, технология PolyXen®). Кроме того, как известно в данной области техники, аминокислотные замены могут быть сделаны в различных положениях внутри конструктора антитела, например, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как ПЭГ.

Метки.

В некоторых вариантах реализации, ковалентная модификация конструктора антител по изобретению включает добавление одной или нескольких меток. Метящая группа может быть соединена с конструктором антитела через спейсерные плечи различной длины, чтобы уменьшить потенциальное стерическое несоответствие. Различные способы для мечения белков известны в техники и могут быть использованы при реализации данного изобретения. Термин "метка" или "метящая группа" относится к любой детектируемой метке. В общем, метки попадают в различные классы, в зависимости от анализа, в котором они должны быть детектированы, - следующие примеры включают, но не ограничиваются:

- a) изотопные метки, которые могут быть радиоактивными или тяжелыми изотопами, такими как радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{111}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I),
- b) магнитные метки (например, магнитные частицы),
- c) окислительно-восстановительные активные группы,
- d) оптические красители (включая, но не ограничиваясь ими, хромофоры, люминофоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут быть либо "мелкомолекулярными" флуороорами, либо белковыми флуороорами,
- e) ферментативные группы (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза),
- f) биотинилированные группы,
- g) преддетерминированные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пары лейциновой застежки-молнии, сайты связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, метки эпитопа и т.д.).

Под "флуоресцентной меткой" понимается любая молекула, которая может быть детектирована посредством присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают, но не ограничиваются ими, флуоресцеин, родамин, тетраметилборамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, люцифер желтый, каскад Blue J, тexasский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (PE) (Молекулярные зонды, Eugene, OR), FITC, родамин и тexasский красный (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook у Richard P. Haugland.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают, но не ограничиваются ими, зеленый флуоресцентный белок, в том числе виды Renilla, Ptilosarcus или Aequorea GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6: 178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люцифераза (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150: 5408-5417), β -галактозидаза (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2603-2607) и Renilla (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, патенты США 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Домены лейциновой застежки-молнии представляют собой пептиды, которые способствуют олигомеризации белков, в которых они обнаружены. Лейциновые застежки-молнии были первоначально идентифицированы в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, Science 240: 1759) и с тех

пор были обнаружены во множестве различных белков. Среди известных лейциновых застежек-молний встречаются природные пептиды и их производные, которые димеризуют или тримеризуют. Примеры доменов лейциновых застежек-молний, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в патентной заявке PCT WO 94/10308, а лейциновая застежка-молния, полученная из белка поверхностно-активного вещества D (SPD) легкого, описанная у Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344: 191. Применение модифицированной лейциновой застежки-молнии, которая обеспечивает стабильную тримеризацию гетерологичного белка, слитого с ней, описано у Fanlow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. В одном варианте реализации, рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент антитела CDH19 или производное, слитое с пептидом лейциновой застежки-молнии, экспрессируются в подходящих клетках-хозяевах, а растворимые олигомерные фрагменты антитела CDH19 или производные, которые образуются, выделяют из супернатанта культуры.

Конструкт антитела может также содержать дополнительные пептиды или домены, которые, например, полезны при выделении молекулы или относятся к адаптированному фармакокинетическому профилю молекулы. Домены, полезные для выделения конструкта антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично введенных фрагментов, которые могут быть захвачены способом выделения, например выделительной колонкой. Неограничивающие варианты реализации таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Muc-tag, HAT-tag, HA-tag, TAP-tag, GST-tag, домен, связывающий хитин (CBD-tag), белок, связывающий мальтозу (MBP-tag), Flag-tag, Strep-tag и их варианты (например, StrepII-tag) и His-tag. His-tag-домены хорошо известны как повторы последовательных His остатков в аминокислотной последовательности молекулы, предпочтительно из шести His остатков. Домены или пептиды, полезные для увеличения времени полужизни в сыворотке крови (т.е. времени, когда 50% вводимого лекарственного средства удаляются с помощью биологических процессов, например метаболизма, экскреция и т.д.) конструктов антител, включают те, которые способны связываться с другими белками с предпочтительным фармакокинетическим профилем в организме человека, такие как сывороточный альбумин (например, пептид AB156) или константная область иммуноглобулинов (Fc-домены или их варианты).

Предполагается, что конструкт биспецифического одноцепочечного антитела присутствует в фармацевтической композиции по изобретению в концентрации примерно до 5 мг/мл, т.е. около 4,0, 3,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,25 или 0,1 мг/мл. Предпочтительно конструкт биспецифического одноцепочечного антитела присутствует в фармацевтической композиции в концентрации от 0,1 до 5 мг/мл, предпочтительно 0,2-2,5 мг/мл, более предпочтительно 0,25-1,0 мг/мл.

Циклодекстрины.

Помимо конструкта биспецифического одноцепочечного антитела и буфера, фармацевтическая композиция по данному изобретению дополнительно содержит β -циклодекстрин. В общем, термин "циклодекстрин" или "CD" относится к циклическим олигосахаридам, состоящим по меньшей мере из 6 или более 1→4 связанных единиц α -D-глюкопиранозида. Унитарная структура циклодекстринов характеризуется гидрофобной полостью с эфирными группами внутри и полярной внешней стороной, которая характеризуется первичными гидроксильными группами. Многие циклодекстрины известны в данной области техники, включая 6-членные (α -циклодекстрины), 7-членные (β -циклодекстрины) и 8-членные (γ -циклодекстрины) циклодекстрины. β -циклодекстрины, содержащие единицы 7 α -D-глюкопиранозида, являются особенно предпочтительными компонентами фармацевтической композиции по изобретению, поскольку они, как было показано, способны эффективно стабилизировать конструкты биспецифических одноцепочечных антител в различных условиях стресса.

Термин "циклодекстрин" (и, в частности, " β -циклодекстрин") также охватывает химически модифицированные производные (β -)циклодекстрина. В общем, любая химическая модификация вероятна до тех пор, пока она не уменьшает или не отменяет выгодные свойства фармацевтической композиции, как показано в прилагаемых примерах, и, в частности, если фармацевтические композиции сохраняют свою стабильность. Химически модифицированные производные циклодекстрина обычно являются результатом этерификации или введения других функциональных групп в 2-, 3- и 6-гидроксильные группы глюкозных остатков. Таким образом, этот термин включает циклодекстрины, содержащие одну или несколько замен гидроксильных групп, например алкилированных и гидроксильных циклодекстринов.

Для целей изобретения термин "циклодекстрин" также включает его фармацевтически приемлемую соль(и). Выражение "фармацевтически приемлемая соль(и)", как используется в данном документе, означает такие соли циклодекстринов, которые являются безопасными и эффективными для введения. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как соединения, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и те, которые образованы катионами, такими как соединения, полученные из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д. Конечно, любые противоионы, используемые в фармацевтических препаратах, должны считаться безопасными, и существует несколько списков фармацевтически одобренных противоионов, которые различаются в зависимости от источника. Утвержденные солеобразователи, например, можно найти в Handbook of Pharmaceutical

Salts (Stahl PH, Wermuth CG, editors. 2002. Handbook of pharmaceutical salts: Properties, selection and use. Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA.).

Таким образом, предполагается, что фармацевтическая композиция по изобретению содержит β -циклодекстрин, в частности, такой, который выбран из группы, состоящей из β -циклодекстрина, метил- β -циклодекстрина, гидроксиэтил- β -циклодекстрина, гидроксипропил- β -циклодекстрина, этил- β -циклодекстрина, бутил- β -циклодекстрин сукцинил-(2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина, гептакис(2,3,6-три-О-метил)- β -циклодекстрина, гептакис(2,3,6-три-О-бензоил)- β -циклодекстрина, натриевой соли β -циклодекстринфосфата, натриевой соли β -циклодекстринсульфата, триацетил- β -циклодекстрина, гептакис(6-О-сульфо)- β -циклодекстриновой гептанатриевой соли, натриевой соли карбоксиметил- β -циклодекстрина, сульфобутиловой эфир- β -циклодекстриновой натриевой соли и 6-О- β -толуолсульфонил- β -циклодекстрина. В частности, β -циклодекстрин может быть натриевой солью сульфобутилового эфира- β -циклодекстрина ("SBE- β -CD"), гидроксипропил- β -циклодекстрином ("HP- β -CD").

β -циклодекстрин может присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации от 0,1 до 20% (мас./об.), предпочтительно от 0,5 до 2% (мас./об.), и более предпочтительно от 0,8 до 1,5% (мас./об.). В частности, предполагается, что концентрация химически немодифицированного β -циклодекстрина составляет около 1,8% (мас./об.) или менее, например около 1,6% (мас./об.), около 1,5% (мас./об.), примерно 1,4% (мас./об.), около 1,3% (мас./об.), около 1,2% (мас./об.), около 1,1% (мас./об.), около 1,0% (мас./об.), (мас./об.), около 0,9% (мас./об.), около 0,8% (мас./об.) или менее, вплоть до концентрации около 0,1% (мас./об.).

Буферы.

Фармацевтическая композиция по изобретению дополнительно содержит буфер, который может быть выбран из группы, состоящей из фосфата калия, уксусной кислоты/ацетата натрия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты/сукцината натрия, винной кислоты/тартрата натрия, гистидина/гистидина HCl, глицина, триса, глутамата, ацетата и их смеси, в частности из фосфата калия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты, гистидина, глутамата, ацетата и их комбинаций.

Подходящие концентрации буфера включают концентрации около 200 мМ или менее, такие как около 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 5 мМ. Специалист в данной области техники легко сможет регулировать концентрации буфера, чтобы обеспечить стабильность фармацевтической композиции, как описано в данном документе. Предполагаемые концентрации буфера в фармацевтической композиции по изобретению конкретно находятся в диапазоне примерно от 5 до примерно 200 мМ, предпочтительно примерно от 5 до примерно 100 мМ и более предпочтительно примерно от 10 до примерно 50 мМ.

pH.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может иметь pH в диапазоне примерно от 4 до примерно 7,5, т.е. pH 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7 или 7,5. Предпочтительно pH находится в интервале примерно от 5 до примерно 7,5, более предпочтительно примерно от 5,5 до примерно 7,5.

Фармацевтическая композиция.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, которая подходит для введения субъекту, нуждающемуся в этом. Термины "субъект" или "индивидуум" или "животное" или "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения любого субъекта, особенно субъекта млекопитающего, для которого желательно введение фармацевтической композиции по изобретению. К субъектам млекопитающих относятся люди, животные-приматы, собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.п., причем люди являются предпочтительными субъектами. Фармацевтическая композиция по данному изобретению является стабильной и фармацевтически приемлемой, т.е. способной вызывать желаемый терапевтический эффект, не вызывая нежелательных местных или системных эффектов у субъекта, которому вводится фармацевтическая композиция. Фармацевтически приемлемые композиции по изобретению могут, в частности, быть стерильными и/или фармацевтически инертными. В частности, термин "фармацевтически приемлемый" может означать одобренный регулирующим органом или другой общепризнанной фармакопеей для применения на животных и, более конкретно, на людях.

Фармацевтическая композиция по изобретению включает один или несколько описанных в данном документе конструктор(-ов) биспецифических одноцепочечных антител, предпочтительно в терапевтически эффективным количестве, β -циклодекстрин и буфер. Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается количество указанного конструктора, которое вызывает желаемый терапевтический эффект. Терапевтическая эффективность и токсичность могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или экспериментальных животных, например ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% выборки) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% выборки). Соотношение доз между терапевтическим и токсическим эффектами является терапевтическим показателем и может быть выражено как отношение ED₅₀/LD₅₀. Обычно предпочтительны фармацевтические композиции, которые демонстрируют большие терапевтические показатели.

Наполнители.

Помимо β -циклодекстрина и буфера, описанного ранее, фармацевтическая композиция может не обязательно содержать один или несколько дополнительных наполнителей, если они не уменьшают или не отменяют ее выгодные свойства, как описано в данном документе, и, в частности, ее стабильность.

Наполнители могут использоваться в изобретении для самых разных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств композиций, таких как регулирование вязкости и/или способов по изобретению для дальнейшего повышения эффективности и/или для дальнейшей стабилизации таких составов и процессов против деградации и порчи из-за, например, стрессов, возникающих во время изготовления, транспортировки, хранения, предварительной обработки, введения и последующего использования. Термин "наполнитель", как правило, включает наполнители, связующие вещества, разрыхлители, покрытия, сорбенты, антиадгезивы, скользящие вещества, консерванты, антиоксиданты, ароматизаторы, красители, средства для отбеливания, растворители, сорастворители, буферные агенты, хелатирующие агенты, агенты, придающие вязкость, поверхностно активные агенты, разбавители, увлажнители, носители, разбавители, консерванты, эмульгаторы, стабилизаторы и модификаторы тоничности.

Приемлемые наполнители предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми, т.е. нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях.

Примеры наполнителей включают, без ограничения:

аминокислоты, такие как глицин, аланин, глютамин, аспарагин, треонин, пролин, 2-фенилаланин, включая заряженные аминокислоты, предпочтительно лизин, ацетат лизина, аргинин, глутамат и/или гистидин консерванты, включая противомикробные препараты, такие как антибактериальные и противогрибковые средства;

антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, метионин, сульфит натрия или гидросульфит натрия;

буферы, буферные системы и буферные агенты, которые используются для поддержания композиции при физиологическом pH или при несколько более низком pH, обычно в диапазоне pH примерно от 5 до примерно 8 или 9; примерами буферов являются борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты, сукцинат, фосфат, гистидин и ацетат; например, трис-буфер с pH около 7,0-8,5 или ацетатный буфер около 4,0-5,5;

неводные растворители, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат;

водные носители, включая воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды;

биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры;

объемообразующие агенты, такие как маннитол или глицин;

хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА);

изотонические и агенты, замедления абсорбции;

комплексообразователи, такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин) наполнители;

моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); углеводы могут быть невосстанавливающими сахарами, предпочтительно трегалозой, сахарозой, октасульфатом, сорбитом или ксилитом;

(низкомолекулярные) белки, полипептиды или белковые носители, такие как человеческий или бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, предпочтительно человеческого происхождения";

красители и ароматизаторы;

серосодержащие восстановители, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, а монотиоглицерин и тиосульфат натрия разбавители;

эмульгаторы;

гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон) солеобразующие противоионы, такие как натрий;

консерванты, такие как антимикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и тому подобное; примерами являются бензалконийхлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода);

растворители и сорастворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль);

сахара и сахарные спирты, включая полиолы, трегалозу, сахарозу, октасульфат, маннит, сорбит или ксилит, стахиозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, рибозу, миониситозу, галактозу, лактит, рибитол, мионизитол, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит), полиэтиленгликоль; и многоатомные сахарные спирты;

суспендирующие агенты;

поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты, такие как плуроники, ПЭГ, сложные

эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал; поверхностно-активные вещества могут представлять собой моющие средства предпочтительно с молекулярной массой $>1,2$ кДа и/или полиэфиром, предпочтительно с молекулярной массой >3 кДа; неограничивающие примеры предпочтительных моющих средств - Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 и Tween 85; неограничивающими примерами предпочтительных полиэфиров являются ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 и ПЭГ 5000;

агенты, улучшающие стабильность, такие как сахароза или сорбит;

агенты, усиливающие тоничность, такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннитол сорбит;

парентеральные средства доставки, включая раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатами или фиксированные масла;

внутривенные средства доставки, в том числе жидкие и питательные заменители, электролитные подкрепляющие добавки (например, основанные на декстрозе Рингера).

Специалистам в данной области техники очевидно, что различные наполнители фармацевтической композиции (например, перечисленные выше) могут иметь различные эффекты, например и аминокислота может действовать как буфер, стабилизатор и/или антиоксидант; маннитол может действовать как наполнитель и/или агент, повышающий тоничность; хлорид натрия может действовать как средство доставки и/или агент, повышающий тоничность; и т.п.

Полиола представляют собой полезные стабилизирующие агенты как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физической и химической деградации, а также полезны для корректировки тоничности составов. Полиолы включают сахара, например маннитол, сахарозу и сорбит и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и для целей данного описания полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные вещества. Маннитол обычно используется для обеспечения структурной стабильности осадка в лиофилизированных составах. Он обеспечивает структурную стабильность в осадке. Обычно его используют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбитол и сахароза являются широко используемыми агентами для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов, от замораживания-размораживания во время транспортировки или подготовки наполнителя во время производственного процесса. ПЭГ полезен для стабилизации белков и как криопротектор.

Поверхностно-активные вещества обычно используются для предотвращения, минимизации или уменьшения адсорбции на поверхности. Молекулы белка могут быть восприимчивы к адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах воздух-жидкость, твердое вещество и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно изменяются обратно пропорционально концентрации белка. Эти повреждающие взаимодействия обычно изменяются обратно пропорционально концентрации белка и обычно усугубляются физическим перемешиванием, например, возникающим во время транспортировки и обработки продукта. Обычно используемые поверхностно-активные вещества включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот полиэтоксилатов сорбитана и полксамер 188. Поверхностно-активные вещества также обычно используются для контроля конформационной стабильности белка. Использование поверхностно-активных веществ в этом отношении специфично для белка, поскольку любое данное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует некоторые белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты восприимчивы к окислительной деградации и часто, как указано, содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление остатков в боковых цепях белка, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует использовать осторожно, а при их использовании, должны применяться при наименьшей эффективной концентрации.

Антиоксиданты могут в какой-то мере предотвратить нежелательное окисление белков в фармацевтических препаратах, поддерживая надлежащие уровни окружающего кислорода и температуры и, избегая воздействия света. Антиоксидантные наполнители могут также использоваться для предотвращения окислительной деградации белков. Среди полезных антиоксидантов в этом отношении являются восстановители, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты.

Антиоксиданты для использования в терапевтических белковых композициях предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. ЭДТА представляет собой полезный пример.

Ионы металлов могут действовать как кофакторы белка и способствовать образованию координационных комплексов белка. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, при которых деградируют белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, при которых деградируют белки. Ионы магния ($10\text{--}120$ мМ) могут использоваться для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут повысить стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , однако, могут дестабилизировать рчДНКазу. Аналогично, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, он может быть дестабилизирован Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , и его агрегация может быть увеличена ионами Al^{+3} .

Консерванты имеют основную функцию ингибирования роста микроорганизмов и обеспечения сте-

рильности продукта на протяжении всего срока хранения или срока использования лекарственного продукта и особенно необходимы для многодозовых составов. В большинстве случаев, используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю использования с малыми молекулами парентеральных препаратов, разработка белковых составов, включающих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее действие (агрегацию) на белки, и это стало основным фактором ограничения их использования в белковых композициях. На сегодняшний день, большинство белковых препаратов были разработаны только для однократного использования. Однако, когда возможны многодозовые составы, у них есть дополнительное преимущество, обеспечивающее удобство для пациента и повышенную конкурентоспособность. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), где развитие сохраняемых композиций привело к коммерциализации более удобных, многодозовых инъекционных ручек.

Как и следовало ожидать, разработка жидких композиций, содержащих консерванты, более сложна, чем лиофилизированные составы. Лيوфилизированные продукты могут быть лиофилизированы без консерванта и восстанавливаться разбавителем, содержащим консервант во время использования. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, что значительно минимизирует связанные с этим риски стабильности. При использовании жидких композиций эффективность консерванта и стабильность должны сохраняться в течение всего срока хранения продукта (от 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечной рецептуре, содержащей активное лекарственное средство и все компоненты наполнителя.

Соли могут использоваться в соответствии с изобретением, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности фармацевтической композиции и/или для дальнейшего улучшения растворимости и/или физической стабильности конструктора антитела или другого ингредиента. Как известно, ионы могут стабилизировать природное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке, и снижения силы их электростатических взаимодействий, аттрактивных и взаимодействий отталкивания. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, с денатурированными пептидными связями (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшать межмолекулярные электростатические взаимодействия и тем самым предотвращать или уменьшать агрегацию белка и нерастворимость. Ионные молекулы отличаются своим влиянием на белки. Был разработан ряд категорических ранжировок ионов и их влияние на белки, которые могут быть использованы при разработке фармацевтических композиций в соответствии с изобретением. Одним из примеров является ряд Гофмейстера, в котором ранжируются ионные и полярные неионные растворенные вещества, по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы, в большинстве случаев, используют в высоких концентрациях (например, >1 моль сульфата аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливания"). Хаотропы в большинстве случаев используются для денатурации и/или для солюбилизации белков ("всаливания"). Относительная эффективность ионов к "всаливанию" и "высаливанию" определяет их положение в ряду Гофмейстера.

Свободные аминокислоты могут быть использованы в фармацевтической композиции в качестве наполнителей, стабилизаторов и антиоксидантов, а также в других стандартных применениях. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в препарате. Глицин полезен при лиофилизации, для обеспечения правильной структуры и свойств осадка. Аргинин может быть полезен для ингибирования агрегации белка в жидких и лиофилизированных составах. Метионин полезен в качестве антиоксиданта.

Особенно полезными наполнителями для приготовления фармацевтической композиции являются сахароза, трегалоза, маннитол, сорбит, аргинин, лизин, полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер 188, плуроник и их комбинации. Указанные наполнители могут присутствовать в фармацевтической композиции в разных концентрациях до тех пор, пока композиция проявляет желаемые свойства, как проиллюстрировано в данном документе, и, в частности, способствуют стабилизации содержащихся конструкторов биспецифических одноцепочечных антител. Например, сахароза может присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации между 2 и 12% (мас./об.), т.е. в концентрации 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2% (мас./об.).

Предпочтительные концентрации сахарозы составляют от 4 до 10% (мас./об.), и более предпочтительно от 6 до 10% (мас./об.). Полисорбат 80 может присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации между 0,001 и 0,5% (мас./об.), т.е. в концентрации 0,5, 0,2, 0,1, 0,08, 0,05, 0,02, 0,01, 0,008, 0,005, 0,002 или 0,001% (мас./об.).

Предпочтительные концентрации полисорбата 80 находятся в пределах от 0,002 до 0,5% (мас./об.), и предпочтительно от 0,005 до 0,02% (мас./об.).

Предлагаемая в данном документе фармацевтическая композиция может включать, в частности, один или несколько консервантов.

Полезные консерванты для приготовления фармацевтических композиций обычно включают про-

тивомикробные средства (например, антибактериальные или противогрибковые средства), антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и тому подобное; примерами являются: бензалконийхлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода). Антимикробные консерванты представляют собой вещества, которые используются для продления срока годности лекарств путем снижения распространения микроорганизмов. Консерванты, которые особенно полезны для приготовления фармацевтической композиции по изобретению, включают бензиловый спирт, хлорбутанол, фенол, метакрезол, метилпарабен, феноксиэтанол, пропилпарабен тиомеросал. Структура и типичная концентрация для использования этих консервантов описаны в табл. 1 у Meyer et al. J Pharm Sci. 96(12), 3155.

Вышеупомянутые консерванты могут присутствовать в фармацевтической композиции в различных концентрациях. Например, бензиловый спирт может присутствовать в концентрации от 0,2 до 1,1% (об./об.), хлорбутанол в концентрации от 0,3 до 0,5% (об./об.), фенол в концентрации от 0,07 до 0,5% (об./об.), метакрезол в концентрации от 0,17 до 0-32% (об./об.) или тиомеросал в концентрации от 0,003 до 0,01% (об./об.). Предпочтительные концентрации для метилпарабена находятся в диапазоне 0,05 и 0,5% (об./об.), для феноксиэтанола в диапазоне 0,1 и 3% (об./об.) и для пропилпарабена в диапазоне 0,05 и 0,5% (об./об.).

Однако также представляется возможным, что фармацевтическая композиция не содержит никаких консервантов. В частности, данное изобретение, среди прочего, обеспечивает фармацевтическую композицию, свободную от консервантов, содержащую конструкторы биспецифических одноцепочечных антигенов, имеющих аминокислотную последовательность, приведенных в SEQ ID NO: 100 и 110, в концентрации около 0,5 мг/мл, сульфобутилового эфира β -циклодекстрина в концентрации около 1% (мас./об.) и фосфата калия в концентрации около 10 мМ и дополнительной сахарозы в концентрации около 8% (мас./об.) и полисорбата 80 в концентрации около 0,01% (мас./об.) при pH около 6,0.

Форма.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть составлены в различных формах, например в твердой, жидкой, замороженной, газообразной или лиофилизированной форме и может быть, среди прочего, в виде мази, крема, трансдермальных пластырей, геля, порошка, таблетки, раствора, аэрозоля, гранул, пилюль, суспензий, эмульсии, капсулы, сиропы, жидкости, эликсиры, экстракты, настойки или жидких экстрактов.

В большинстве случаев, для фармацевтической композиции по изобретению допустимы различные формы запасаения/дозировки, т.е. в зависимости от предполагаемого пути введения, характера доставки и желаемой дозировки (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed., (2012)). Специалист в данной области техники должен знать, что такой выбор конкретной лекарственной формы может, например, влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* конструктора антигена по изобретению.

Например, первичный носитель или носитель в фармацевтической композиции может быть либо водным, либо неводным по своей природе. Подходящим средством доставки или носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно дополненная другими материалами, обычными в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные средства доставки.

Когда предусматривается парентеральное введение, терапевтические композиции по изобретению могут быть представлены в форме не содержащих пирогенов, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего желаемый конструктор антигена в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно подходящим средством для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой конструктор антигена составлен в виде стерильного изотонического раствора, сохраненного должным образом. Препарат может включать приготовление желаемой молекулы с помощью агента, такого как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может доставляться посредством инъекции замедленного всасывания. Также может быть использована гиалуроновая кислота, которая имеет эффект стимуляции длительного периода в кровотоке. Имплантируемые устройства доставки лекарственного средства могут использоваться для введения желаемого конструктора антигена.

Препараты с замедленной или контролируемой подачей/высвобождением также предусмотрены в данном документе. Специалистам в данной области техники также известны методы для разработки множества других замедленных или контролируемых средств доставки, таких как липосомные носители, биоразрушаемые микрочастицы или пористые гранулы и инъекции веществ замедленного всасывания. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, которая описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в форме изделий, имеющих форму, например пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэферы, гидрогели, полилактиды (как описано в патенте США №

3773919 и публикации Европейской патентной заявки № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2: 547-556), поли (2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 and Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D (-)-3-гидроксимаслянную кислоту (публикация Европейской патентной заявки № EP 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены любым из нескольких способов, известных в данной области техники. See, e.g., Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-3692; Публикация Европейской патентной заявки No EP 036676; EP 088046 и EP 143949. Конструкты антител можно также заключить в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или путем межфазной полимеризации (например, гидроксиметилцеллюлоза или желатин-микрокапсулы и поли (метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно), в системах доставки коллоидных лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокapsулы) или в макроэмульсиях. Такие методы раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed., (2012).

Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, обычно предоставляются в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно осуществлять путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Когда композиция лиофилизирована, стерилизация с использованием этого способа может быть проведена либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например внутривенный пакет раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции.

Конструкты антител, описанные в данном документе, могут также быть составлены в виде иммунолипосом. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые полезны для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно собирают в бислойную структуру, аналогичную расположению липидов биологических мембран. Липосомы, содержащие конструкт антитела, получают способами, известными в данной области техники, такими как описано в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); патенте США № 4485045 и 4544545; и WO 97/38731. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556. Особенно полезные липосомы могут быть получены способом обращено-фазового выпаривания с липидной композицией, включающей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivatизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы продавливают через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы с требуемым диаметром. Fab' -фрагменты конструкта антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано у Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) посредством реакции дисульфидного обмена. Химиотерапевтическое средство необязательно содержится в липосоме. См. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Дополнительные активные агенты.

Предполагается, что композиция по изобретению может содержать, помимо описанного в данном документе конструкта биспецифического одноцепочечного антитела, дополнительные биологически активные агенты в зависимости от предполагаемого использования композиции. Такими агентами могут быть, в частности, лекарственные средства, действующие на опухоли и/или злокачественные клетки, но также возможны другие активные агенты в зависимости от предполагаемого использования фармацевтической композиции, включая агенты, действующие на желудочно-кишечную систему, лекарственные средства, ингибирующие иммунореакции (например, кортикостероиды), препараты, модулирующие воспалительный ответ, препараты, действующие на систему кровообращения и/или агенты, такие как цитокины, известные в данной области техники. Также предполагается, что фармацевтическая композиция по данному изобретению применяется в совместной терапии, т.е. в сочетании с другим противораковым лекарственным средством.

Хранение.

После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие композиции могут храниться либо в готовой к употреблению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которая восстанавливается перед введением. Например, лиофилизированные композиции могут быть восстановлены, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWFI), физиологическом солевом растворе, забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) или в той же композиции, что и белок до лиофилизации.

Способ введения.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно в целом готовить для доставки любым подходящим способом введения. В контексте данного изобретения способы введения включают, но не ограничиваются, местные способы (такие как эпикутальный, ингаляционный, назальный, офтальмологический, ауркулярный/ушной, вагинальный, слизистый), энтеральные способы (такие как оральный, желудочно-кишечный, подязычный, сублабиальный, буккальный, ректальный); и парентеральные пути

(такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставной, внутрисердечной, интрадермальный, внутриочаговый, внутриматочный, внутрипузырный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасиновиальный, интритпросветный).

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, особенно пригодны для парентерального введения, например подкожной или внутривенной доставки, например, путем инъекции, такой как болюсная инъекция, или путем инфузии, такой как непрерывная инфузия. Фармацевтические композиции можно вводить с использованием медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851; и 5399163.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно также вводить непрерывно. В качестве неограничивающего примера, непрерывное или практически непрерывное, т.е. постоянное введение, может быть реализовано с помощью небольшой насосной системы, которую носит пациент для дозирования притока конструкта антитела в тело пациента. Фармацевтическую композицию можно вводить, используя указанные насосные системы. Такие насосные системы обычно известны в данной области техники и обычно зависят от периодической смены картриджей, содержащих терапевтический агент, который нужно вводить. При обмене картриджа в такой насосной системе может произойти временное прерывание, так или иначе, непрерывного потока терапевтического агента в организм пациента. В таком случае фаза введения перед заменой картриджа и фаза введения после замены картриджа все еще будут рассматриваться в значении фармацевтических средств и способов согласно изобретению вместе, составляя одно "непрерывное введение" такого терапевтического агента.

Продолжительное или непрерывное введение фармацевтической композиции по изобретению может быть внутривенным или подкожным через устройство для доставки жидкости или небольшой насосной системы, включающей в себя механизм подачи жидкости для выведения жидкости из резервуара и приводной механизм для приведения в действие приводного механизма. Насосные системы для подкожного введения могут включать иглу или катетер для проникновения в кожу пациента и доставки подходящей композиции в тело пациента. Указанные насосные системы могут быть непосредственно закреплены или прикреплены к коже пациента независимо от вены, артерии или кровеносного сосуда, тем самым обеспечивая прямой контакт между насосной системой и кожей пациента. Насосная система может быть прикреплена к коже пациента в течение 24 ч и до нескольких дней. Насосная система может быть небольшого размера с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера объем резервуара для подходящей фармацевтической композиции, подлежащей введению, может составлять от 0,1 до 50 мл.

Продолжительное введение также может быть достигнуто трансдермально посредством пластыря, носимого на коже и заменяемого с интервалами. Специалист в данной области техники знает системы пластырей для доставки лекарств, подходящих для этой цели. Следует отметить, что трансдермальное введение особенно поддается непрерывному введению, так как обмен первого израсходованного пластыря может быть успешно осуществлен одновременно с размещением нового второго пластыря, например, на поверхности кожи, непосредственно примыкающей к первому отработанному пластырю и непосредственно перед удалением первого отработанного пластыря. Проблема с прерыванием потока или сбоя подачи вещества не возникает.

Специалист в данной области техники легко поймет, что фармацевтическая композиция по изобретению может содержать любой из вышеупомянутых наполнителей или дополнительные активные агенты или может быть предоставлена в любой подходящей форме до тех пор, пока она является стабильной и предпочтительно обладает теми же преимуществами, что и фармацевтические композиции, содержащие β -циклодекстрины, которые были оценены в прилагаемых примерах. Специалист в данной области техники легко сможет регулировать различные компоненты, для обеспечения стабильной фармацевтической композиции, т.е. предпочтительно, по существу, не содержащей агрегатов и/или конформеров фрагментов биспецифических одноцепочечных антител, входящих в состав.

Следует отметить, что, используемые в данном документе, единственные формы включают множественные формы, если контекст явно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "реагент" включает один или несколько таких различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные этапы и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными в данном документе.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу ряда. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты предназначены для охвата данным изобретением.

Термин "и/или" везде, где он используется, включает в себя значение "и", "или" и "все или любую другую комбинацию элементов, связанных указанным термином".

Используемый в данном документе термин "около" или "приблизительно" означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10%, и более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Он включает, однако, также конкретное число, например около 20, включает в себя 20.

Термин "меньше чем" или "больше чем" включает конкретное число. Например, менее чем 20 означает меньше чем или равно ему. Точно так же больше или свыше чем, означает больше или равно или свыше или равно, соответственно.

В данном описании изобретения и последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержит" и его вариации, такие как "включает" и "содержащий", следует понимать как включающее указанное целое значение или этап, или группу целых значений или этапов, но не исключающее любое другое целое значение, или этап или группу целых значений или этапов. При использовании в данном документе термина "содержащий", он может быть заменен термином "включающий" или "в том числе" или иногда, когда он используется в данном документе, термином "имеющий".

При использовании в данном документе "состоящий из", исключается любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в пункте заявленной формулы изобретения. При использовании в данном документе термина "состоящий в основном из", не исключаются материалы или этапы, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения.

В каждом примере данного документа любой из терминов "содержащий", "состоящий в основном из" и "состоящий из", может быть заменен любым из двух других терминов.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами, материалами, реагентами и веществами и т.д., описанными в данном документе и которые могут варьировать. Используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема данного изобретения, которое будет ограничено только прилагаемой формулой изобретения.

Все публикации и патенты, приведенные в тексте этого изобретения (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, изобретения производителя, инструкции и т.д.), независимо от того, являются ли они приведенными выше или ниже, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Ничто в настоящем документе не должно толковаться как признание того, что изобретение не имеет права преподносить такое описание в силу предшествующего изобретения. В той части, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или несовместим с данным изобретением, изобретение будет заменять любой такой материал.

Лучшее понимание данного изобретения и его преимуществ будет получено из следующих примеров, представленных только в иллюстративных целях. Примеры не предназначены для ограничения объема данного изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1. Влияние стресса, индуцированного температурой на композиции, содержащие AMG330 и HP- β -CD.

Очищенный белок AMG 330 (SEQ ID NO: 100), полученный при помощи хроматографии на гидроксиapatите, диализовали в основной буфер композиции, состоящий из 100 мМ трис-основания, 50 мМ динатрийгидрофосфата, 4% (мас./об.) дигидрата трегалозы при pH 5,2. Конечная точка диализа была подтверждена измерениями осмоляльности. Диализованный объем концентрировали ультрафильтрацией и центрифугированием до концентрации 0,96 мг/мл и стерилизовали фильтрованием с помощью 0,2 мкм фильтра PVDF (из поливинилиденфторида). Предварительно сформованный объем делили на три объемные фракции одинакового размера. Их доводили до pH 5,2, 5, 6 и 6,0, соответственно, с использованием 5 М гидроксида натрия и снова фильтровали с помощью 0,2 мкм фильтра PVDF. После установления pH предварительно смешанные композиции были снабжены необходимыми объемами исходных растворов, содержащих либо 1% (мас./об.) полисорбат 20, 1% (мас./об.) полисорбат 80, либо 4% (мас./об.) HP- β -CD. Концентрации полисорбата 20, полисорбата 80 и HP- β -CD в конечных составах приведены на фиг. 1. Концентрацию каждой композиции доводили до 0,4 мг/мл, используя базовый буфер, как описано выше. Все наполнители применялись в фармакопейном качестве. Конечные композиции доводили до 150 мкл в полипропиленовых реакционных пробирках и инкубировали в контролируемом шкафу при 30°C в течение 72 ч. Содержание конформера и высокомолекулярных соединений (BMMC) определяли с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC). SE-UPLC проводили на системе UPLC Aquity H-Class (Waters), используя колонку Acquity UPLC BEH200 SEC 150 мм (Waters). Температуру колонки устанавливали равной 25°C. Разделение вариантов по размеру достигалось применением изократического способа со скоростью подвижной фазы 0,4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl, pH 6,8. Общее время записи хроматограммы составляет 6,0 мин. Образцы выдерживали при 8°C в автосамплере до анализа. Вводимый объем составлял 7,5 мкл. Во избежание загрязнения проб, после каждого образца проводили промежуточные введения 40% ACN (ацетонитрила). Детектирование основывалось на флуоресценции (возбуждение (Ex) 280 нм, излучение (Em) 325 нм). Интегрирование пиков выполнялось с использованием программного обеспечения Empower®. Отмечались относительные AUC (площади под кривой) мономера и варианты размеров. Можно

продемонстрировать, что образование немонотических видов белка (включая конформеры и высокомолекулярные вещества) при температурном стрессе (30°C) можно ингибировать присутствием HP-β-CD (фиг. 1). В отличие от композиций, содержащих полисорбат 20 или 80, с течением времени наблюдалось образование немонотических видов.

Пример 2. Влияние поверхностно-индуцированного стресса на композиции, содержащие AMG330 и HP-β-CD.

Дальнейший эксперимент был проведен для того, чтобы оценить, стабилизирует ли HP-β-CD AMG 330 при воздействии поверхностно-индуцированных стрессов. Препарат AMG 330, приготовленный в 35 мМ трис-гидрохлориде, 17,5 мМ гидрофосфате натрия фосфата, 100 мМ гидрохлориде L-аргинина и 1,4% (масса/объем) дигидрате трегалозы, pH 6,0, был дополнен либо полисорбатом 20, 80, либо HP-β-CD при различных концентрациях, приведенных на фиг. 2 (по оси x). Все наполнители применялись в фармакопейном качестве. Препараты доводились до 1,0 мл в предварительно промытых и предварительно стерилизованных стеклянных флаконах I типа. Флаконы закрывали стерилизованными пробирками из бутилового каучука и герметизировали алюминиевыми колпачками. Препараты подвергались стрессу посредством (1) десяти последовательных циклов замораживания/размораживания и (2) вспенивания. Замораживание и размораживание проводили в лиофилизаторе опытного масштаба Epsilon 2-6D (Christ, Germany). Целевые температуры для замораживания и размораживания устанавливались на -50°C и 20°C, соответственно. Используемые скорости замораживания и размораживания 0,3 К/мин. За каждой температурой следовало изотермическое плато сроком до 1 ч. Вспенивание достигалось путем впрыскивания азота в соответствующий раствор в течение 1 ч при 80 мл/мин с использованием инъекционной иглы 21G. Флакон вентилировали с помощью второй инъекционной иглы, снабженной стерильным фильтром. Образцы, хранящиеся при -70°C, использовались в качестве контроля без стрессовых условий. Образцы анализировали с помощью SE-UPLC и визуальной проверки в соответствии с 5 тестом Немецкого кодекса лекарственных средств (DAC). SE-UPLC выполняли как описано в примере 1. Для определения концентрации белка, детектирование дополнительно проводили через поглощение при 280 нм.

Контрольные образцы, не подвергавшиеся стрессу, свидетельствовали, что немонотические виды, включая конформеры, димеры и агрегаты, более многочисленны в композициях, содержащих полисорбат 20 или 80, по сравнению с препаратами с HP-β-CD. При стрессе посредством вспенивания и замораживания/размораживания в композициях, содержащих полисорбаты увеличивались немонотические виды (фиг. 2). Использование HP-β-CD уменьшало образование немонотических видов. В отсутствие какого-либо поверхностно-активного вещества наблюдались потери белка более 80%, тогда как использование полисорбата и HP-β-CD приводило к количественному восстановлению белка. В отличие от композиций, без поверхностно-активных веществ, композиции, содержащие HP-β-CD, практически не содержали белковых агрегатов в диапазоне видимых размеров (табл. 1).

Таблица 1. Оценка видимых частиц согласно PhEur 2.9.20. (Европейской фармакопее).

Оценки результатов исследования, присвоенные в соответствии с 5 тестом

Немецкого кодекса лекарственных средств (DAC)

Обработка	% HP-β-CD	Результат проверки	Выполнение фармакопейных требований (5 тест DAC) ¹
без стресса	0,1	4	да
без стресса	0,5	0	да
без стресса	1	1	да
без стресса	2	3	да
без стресса	без	22	нет
10 x З/Р	0,1	4	да
10 x З/Р	0,5	2	да
10 x З/Р	1	2	да
10 x З/Р	2	4	да
10 x З/Р	без	30	нет
Вспенивание	0,1	6	нет
Вспенивание	0,5	2	да
Вспенивание	1	4	да
Вспенивание	2	3	да
Вспенивание	без	30	нет

¹ фармакопейные требования в соответствии с 5 тестом Немецкого кодекса лекарственных средств (DAC): результат проверки <4.5.

Пример 3. Влияние бензилового спирта на композиции, содержащие AMG103 и HP- β -CD или SBE- β -CD.

Влияние HP- β -CD и SBE- β -CD на стабильность конструкторов антител BiTE® в присутствии бензилового спирта было исследовано в композициях, содержащих 0,6 мг/мл AMG 103 (блинатуломаб). Поэтому AMG 103 был составлен в 20 mM гистидине, 2% (мас./об.) дигидрате трегалозы, 0,9% (мас./об.) хлориде натрия при pH 7,0. Эта композиция была дополнена различными концентрациями либо HP- β -CD (0,5 и 1,0% мас./об.), либо SBE- β -CD (0,5, 1,0 и 2,0% мас./об.). Композиция без циклодекстрина служила в качестве контроля. Концентрация AMG 103 во всех композициях была доведена до 0,6 мг/мл. Все наполнители применялись в фармакопейном качестве. Все композиции смешивали с 0,9% (об./об.) бензиловым спиртом и доводили до 0,5 мл в полипропиленовых реакционных пробирках. Инкубацию проводили при 37°C в течение 24 ч. Образцы анализировали с помощью УФ-спектрофотометрии для определения степени оптической плотности при 350 нм в качестве оценки для агрегации белка и посредством измерения интенсивности излучения собственной флуоресценции для определения потенциальных конформационных изменений. УФ-спектрофотометрию проводили на планшет-ридере Infinite M1000 (Tecan) с использованием прозрачных, с половинным объемом лунок, 96-луночных планшетов (Corning). Каждая лунка была заполнена 100 мкл раствора образца. Измерения образцов проводили в трех повторях. УФ-поглощение регистрировали при 350 нм. Интенсивность излучения собственной флуоресценции анализировали в одном и том же планшете с нижней стороны. Возбуждение осуществлялось при 278 нм. Интенсивность излучения регистрировалась от 300 до 500 нм с шагом в 1 нм. Возбуждающие и эмиссионные диафрагмы были установлены на 10 и 5 нм соответственно. Во время измерений УФ и флуоресценции в планшетах проводили контроль температуры (25°C).

Оптические плотности (ОП) при 350 нм указывают на снижение способности к агрегации AMG 103 в присутствии HP- β -CD или SBE- β -CD. Эффект был более выражен при увеличении концентраций циклодекстрина (фиг. 3). Агрегирование AMG 103 в присутствии бензилового спирта переходит в изменение локального окружения остатков триптофана, проявляющееся посредством собственной флуоресценции. Эти изменения минимизировались с увеличением концентрации различных β -CD (фиг. 4).

Пример 4. Влияние бензилового спирта на композиции, содержащие различные концентрации AMG103 и β -CD.

Влияние увеличенных концентраций HP- β -CD и SBE- β -CD на способность к агрегации AMG 103 (блинатуломаба) рассматривалось с помощью 2-уровневого полного 4-факторного эксперимента. AMG 103 был приготовлен, как описано в примере 2. Однако его концентрация варьировалась от 0,2 до 0,6 мг/мл (табл. 2).

Таблица 2. 2-уровневый полный 4-факторный эксперимент для оценки влияния SBE- β -CD и HP- β -CD на способность к агрегации AMG 103 в присутствии бензилового спирта

β -CD тип	β -CD концентрация % мас./об.	AMG 103 концентрация мг/мл	Бензиловый спирт концентрация% об./об.
HP- β -CD	0,2	0,2	0,5
			0,9
		0,6	0,5
			0,9
	0,6	0,2	0,5
			0,9
		0,6	0,5
			0,9
	0,2	0,2	0,5
			0,9
		0,6	0,5
			0,9
SBE- β -CD	0,6	0,2	0,5
			0,9
	0,2	0,2	0,5
			0,9

Все образцы инкубировали непосредственно в прозрачных с половинным объемом лунок, 96-луночных планшетах (Corning) при 37°C в течение 96 ч. Планшет покрывали липкой пленкой, чтобы избежать потерь при испарении. Опять же, оптические плотности при 350 нм брали как степень агрегации AMG 103 (см. пример 3).

Аналитические данные оценивались с помощью анализа дисперсии (ANOVA) с использованием программного обеспечения Statistica®. Нормальное распределение измеренных значений было графически подтверждено путем построения ожидаемых нормальных значений по отношению к первоначальным продуктам. Прогностические модели (фиг. 5) были созданы в Statistica® на основе регрессии аналитических данных. Таким образом, учитывался чисто фактор влияний, а также брались во внимание линейные взаимодействия между факторами. При заданных концентрациях AMG 103 и бензилового спирта, агрегацию AMG 103 можно уменьшить с увеличением содержания либо HP-β-CD, либо SBE-β-CD (фиг. 5).

Пример 5. Влияние стресса, вызванного хранением, на композиции, содержащие конструкторы биспецифического антитела и β-CD.

Препаративное лекарственное вещество, содержащее приблизительно 1 мг/мл CD332-hALB в 20 мМ фосфате калия, 150 мМ гидрохлориде L-аргинина и 6% (мас./об.) трегалозном дигидрате при pH 6,0 диализовали в 20 мМ лимонной кислоте, 6% (мас./об.) сахарозе при pH 5,0 и 20 мМ фосфате калия, 6% (мас./об.) сахарозе при pH 6,0 соответственно. Конечную точку диализа определяли с помощью измерений осмоляльности. Диализ проводили с использованием устройств Slide A Lyzer®. После диализа материал, забуференный цитратом, был непосредственно сконцентрирован выше 7 мг/мл с помощью комплектов VivaSpin®. Центрифугирование проводили при приблизительно 2000 g в течение 5 мин при 2-8°C. Аналогично обрабатывали буферизованный материал с фосфатом калия. Однако материал был разделен на две одинаковые объемные фракции до стадии центрифугирования. Одну фракцию доводили до pH 7,0. pH второй фракции поддерживали при pH 6,0. После стерильной фильтрации через фильтр PVDF 0,2 мкм концентраты были окончательно составлены путем добавления исходных растворов полисорбата 80 и SBE-β-CD, где это применимо. Целевая концентрация CD33 2-hALB составляла 5,0 мг/мл. Готовыми смешанными композициями заполняли предварительно промытые и предварительно стерилизованные стеклянные флаконы I типа.

Флаконы закрывали стерилизованными пробирками из бутилового каучука и герметизировали алюминиевыми колпачками. Объем наполнения составил 1,0 мл. Общие сведения о составах приведены в табл. 3. Флаконы хранили в течение шести дней в шкафу с контролируемой температурой при 37°C. Высокомолекулярные соединения определяли количественно SE-UPLC с использованием способа, описанного в примере 1. Введенное количество белка составляло 3 мкг.

Таблица 3. Общие сведения о композициях CD33_2-hALB

ID	Лимонная кислота	Фосфат калия	Сахароза	SBE-β-CD	Полисорбат 80	pH
C50SuT	20 мМ		6% мас./об.		0,01% мас./об.	5,0
C50SBESuT	20 мМ		6% мас./об.	1% мас./об.	0,01% мас./об.	5,0
K60SuT		20 мМ	6% мас./об.		0,01% мас./об.	6,0
K60SBESuT		20 мМ	6% мас./об.	1% мас./об.	0,01% мас./об.	6,0
K70SuT		20 мМ	6% мас./об.		0,01% мас./об.	7,0
K70SBESuT		20 мМ	6% мас./об.	1% мас./об.	0,01% мас./об.	7,0

Препараты, содержащие SBE-β-CD (F2, F4, F6), показали более низкое количество высокомолекулярных видов (BMMC) после инкубации по сравнению с препаратами, свободными от циклодекстрина. Эффект был более выражен при pH 6 и 7, чем при pH 5 (фиг. 6).

Пример 6. Влияние ультрафильтрации и диафильтрации на композиции, содержащие конструкторы биспецифических антител и β-CD.

Очищенный MSLN-hALB (т.е. SEQ ID NO: 176) концентрировали пошагово путем ультрафильтрации (UF). Сначала проводили семикратную концентрацию с использованием кассеты с регенерированной целлюлозной мембраной и поверхностью 0,11 м². Дальнейшая семикратная концентрация проводилась с меньшей мембраной с поверхностью 50 см². Обе мембраны имели границу отсечки по молекулярному весу задерживаемых компонентов (MWCO) 10 кДа. Для этапов ультрафильтрации и диафильтрации трансмембранное давление было ограничено 1,4 бар.

Концентрированный продукт был разделен на две части. Первую часть диафильтровали в буфер, состоящий из 20 мМ фосфата калия, 150 мМ гидрохлориде L-аргинина, 6% (мас./об.) дигидрата трегалозы при pH 6,0. Вторую часть диафильтровали в буфер, состоящий из 20 мМ фосфата калия, 2% (мас./об.) сахарозы при pH 6,0. Конечные композиции, перечисленные в табл. 4, были скорректированы путем добавления концентрированных исходных растворов к диафильтрационным материалам. Все наполнители применялись в фармакопейном качестве. Целевая концентрация MSLN-hALB составляла 1,0 мг/мл.

Таблица 4. Общие сведения о композициях MSLN-hALB

ID	Состав композиции
K60RTrT- низкий уровень	20 мМ фосфат калия, 150 мМ L-аргинина HCl, 6% (масса/объем) дигидрат трегалозы, 0,01% (масса/объем) полисорбата 80, pH 6,0
K60SBESuT низкий уровень	20 мМ фосфат калия, 1% (масса/объем) SBE- β -CD, 8% (масса/объем) сахара, 0,01% (масса/объем) полисорбат 80, pH 6,0
K60RMSuT- низкий уровень	20 мМ фосфат калия, 150 мМ L-аргинина HCl, 4% (масса/объем) маннитол, 2% (масса/объем) сахара, 0,01% (масса/объем) полисорбат 80, pH 6,0

Наконец, лекарственное вещество MSLN-hALB стерильно фильтровали через 0,2 мкм PVDF-фильтр и заполняли в предварительно промытые и предварительно стерилизованные стеклянные флаконы I типа. Флаконы закрывали стерилизованными пробирками из бутилового каучука и герметизировали алюминиевыми колпачками. Объем наполнения составил 1,0 мл. Флаконы хранили в течение двух недель в шкафах с контролируемой температурой при 25 и 37°C, соответственно. Высокомолекулярные соединения определяли количественно SE-UPLC с использованием способа, описанного в примере 1. Введенное количество белка составляло 3 мкг. Варианты по заряду кислот определяли с использованием слабой катионообменной ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (WCX-UPLC). WCX-UPLC проводили на UPLC H class Aquity (Waters), используя колонку Protein-Pak Hi Res CM 7 μ m 4,6 $\times$ 100 мм. Температуру колонки устанавливали равной 30°C. Для достижения хроматографического разделения был применен следующий градиент (табл. 5).

Таблица 5. Общие сведения о градиенте WCX-UPLC

Время [мин:сек]	% Элюента А	% Элюента В
0:00	100	0
4:00	100	0
25:00	50	50
25,01	0	100
29:00	0	100
29:01	100	0
33:00	100	0

Элюент А состоял из 20 мМ фосфата натрия при pH 6,5. Элюент В состоял из 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, pH 6,5. Введенное количество белка составляло 3 мкг. Скорость потока составляла 0,65 мл/мин. Перед введением образцы выдерживали в автосамплере при 8°C. Определение белка основывалось на измерении интенсивности внутренней флуоресценции. Возбуждение проводили при 280 нм и эмиссию определяли при 330 нм. Варианты по заряду кислот определяли количественно на основе относительной площади под кривой (AUC). Интегрирование выполнялось с использованием программного обеспечения Empower®.

Для композиции с SBE- β -CD наблюдались самые низкие скорости образования высокомолекулярных видов (BMMC) (фиг. 7B). Химическая стабильность также была наиболее выражена для композиции, содержащей SBE- β -CD, обозначенной самой низкой фракцией вариантов по заряду кислот (фиг. 8).

Пример 7. LLPS у AMG 330 с SBE- β -CD и альгинатом.

LLPS: Разделение фаз на границе жидкость-жидкость (LLPS) вызвано суммарным аттрактивным взаимодействием между коллоидными частицами (например, белками) и, таким образом, является показателем силы этого взаимодействия. Когда есть аттракция между белками, LLPS происходит в сосуществующих фазах, обогащенных белком и обедненных белком, при условии, что температура достаточно низкая. В LLPS сосуществующие фазы находятся в истинном термодинамическом равновесии и полностью обратимы, а концентрации сосуществующих фаз зависят только от температуры, а не от начальной концентрации белка. LLPS можно индуцировать добавлением ПЭГ. Если есть более сильная аттракция между белками, тем ниже концентрация ПЭГ, которая необходима для LLPS, что, в свою очередь, указывает на то, что эти белки легко агрегируются. При данной температуре и концентрации ПЭГ, наполнители, повышающие коллоидную стабильность белка, приводят к более высокой концентрации белка в фазе, обедненной белком. Это увеличение концентрации белка может быть измерено хроматографически относительно контроля без наполнителя. При разработке рецептуры желательно наблюдать LLPS и оценивать аттракцию между белковыми молекулами.

Целью этого эксперимента является использование LLPS для оценки влияния SBE- β -CD и альгината на коллоидную стабильность AMG 330.

Таблица 6. Состав композиции и приготовление

ID раствора	Состав раствора	Приготовление раствора	Объем
A	AMG 330 (1,2 мг/мл)	Не применялось	Требуется 180 мкл
B.	1X PBS	5 мл 10X PBS+45 мл воды качества milli Q	50 мл
C	50% SBE- β -CD в 1X PBS (рН в соответствии с 1х PBS)	5 г в 10 г	
D	1% SBE- β -CD в 1X PBS	100 мкл C+4,9 мл B	5 мл
E	0,1% SBE- β -CD в 1X PBS	10 мкл+4,99 мл B	5 мл
F	1% альгинат в 1х PBS (рН для соответствия 1X PBS)	0,2 г в 20 г	
G	0,1% альгината в 1х PBS	500 мкл F+4,5 мл B	5 мл
H	24% ПЭГ 3350 в 1X PBS	4,8 г в 20 г	

Таблица 7. Композиция образца и приготовление

ID образца	Состав образца	Приготовление образца	Конечный объем (мкл)
1-1	AMG 330+1X PBS, 0% ПЭГ	(10 мкл A+40 мкл B)+50 мкл B	100
1-2	AMG 330+1X PBS, 0% ПЭГ	(10 мкл A+40 мкл B)+50 мкл B	100
2-1	AMG 330+1X PBS, 12% ПЭГ	(10 мкл A+40 мкл B)+50 мкл H	100
2-2	AMG 330+1X PBS, 12% ПЭГ	(10 мкл A+40 мкл B)+50 мкл H	100
3-1	AMG 330+0,001% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 мкл E+39 мкл B)+50 мкл H	100
3-2	AMG 330+0,001% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 мкл E+39 мкл B)+50 мкл H	100
4-1	AMG 330+0,01% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 μ L D+39 мкл B)+50 мкл H	100
4-2	AMG 330+0,01% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 μ L D+39 мкл B)+50 мкл H	100
5-1	AMG 330+0,1% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+10 мкл D+30 мкл B)+50 мкл H	100
5-2	AMG 330+0,1% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+10 мкл D+30 мкл B)+50 мкл H	100
6-1	AMG 330+1% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+2 мкл C+38 мкл B)+50 мкл H	100
6-2	AMG 330+1% SBE- β -CD, 12% ПЭГ	(10 мкл A+2 мкл C+38 мкл B)+50 мкл H	100
7-1	AMG 330+0,001% альгинат, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 мкл G+39 мкл B)+50 мкл H	100
7-2	AMG 330+0,001% альгинат, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 мкл G+39 мкл B)+50 мкл H	100
8-1	AMG 330+0,01% альгинат, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 мкл F+39 мкл B)+50 мкл H	100
8-2	AMG 330+0,01% альгинат, 12% ПЭГ	(10 мкл A+1 мкл F+39 мкл B)+50 мкл H	100
9-1	AMG 330+0,1% альгинат, 12% ПЭГ	(10 мкл A+10 мкл F+30 мкл B)+50 мкл H	100
9-2	AMG 330+0,1% альгинат, 12% ПЭГ	(10 мкл A+10 мкл F+30 мкл B)+50 мкл H	100

Был приготовлен другой раствор/образец композиции, как указано в табл. 6 и 7 выше. Образцы готовили (конечная концентрация AMG 330 0,12 мг/мл) и инкубировали при 40°C в течение трех дней. Затем образцы микроцентрифугировали (центрифуга Eppendorf 5418, St.Louis, MO, USA) в течение 20 с и

80 мкл супернатанта удаляли и анализировали с помощью аналитической СЕХ (катионообменной хроматографии) (колонка ProPac WCX-10, 2 мм ID) в хроматографической системе Agilent (Agilent 1200, Santa Clara, CA, USA).

Аналитическая СЕХ: 70 мкл образца вводили в колонку СЕХ, которую кондиционировали 20 mM лимонной кислотой, 0,005% азидом натрия, pH 6,0 и элюировали 20 mM лимонной кислотой, 1 M хлоридом натрия, 0,005% азидом натрия, pH 6,0, с временем градиентного элюирования 30 мин (общее время анализа: 45 мин/ввод) с максимальной концентрацией 500 mM хлорида натрия при скорости потока 0,2 мл/мин. Во время хроматографического анализа температуру автосамплера поддерживали на уровне 40°C. На хроматограммах рассчитывались площади пиков образцов (фиг. 9 и 10).

Пример 8. Буферный обмен и концентрация белка AMG 330 при ультрафильтрационном центрифугировании в присутствии 4 различных композиций (включая SBE-β-CD).

Таблица 8. Состав раствора и приготовление (объем в мл)

ID раствора	Композиция раствора	Приготовление раствора	Объем для приготовления
A	0,4 мг/мл AMG 330	не применялось	17 мл
B	10 mM цитрат, pH 6,0	"	не применялось
C	40% каптизол в 1xPBS	"	"
D	500 mM аргинин, 500 mM глутамин в B, pH 6,0	"	"
E	35 mM трис, 17,5 mM фосфат натрия, 50 mM аргинин, 1,4% трегалоза, pH 6,0	"	"
F	65% сахара (мас/об) в B	"	"
G	18% маннитол (мас/об) в B	"	"
H	1% полисорбат 80 (мас/об) в B	"	"
I	1% ПЭГ-4000 (мас/об) в E, pH 6,0	"	"
J	10 mM цитрат pH 6,0, 1% каптизол	97, 5 мл B+2, 5 мл C	100 мл
K	35 mM трис, 17,5 mM фосфат натрия, 50 mM аргинин, 1,4% трегалоза, 0,05 ПЭГ 4000, pH 6,0	95 мл E+5 мл I	"
L	10 mM цитрат, 50 mM аргинин, 50 mM глутамин, 2% сахара, 4% маннитол, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0	63,8 мл B+10 мл D+3,1 мл F+ 22,2 мл G+1 мл H	"

Таблица 9. Композиция образца и приготовление

ID образца	Композиция образца	Приготовление образца
1-1	AMG 330 в 10 mM цитрате, pH 6,0	2 мл A, замена буфера в B при центрифугировании/фильтрации
1-2	"	"
2-1	AMG 330 в 10 mM цитрате, pH 6,0, 1% каптизол	2 мл A, замена буфера в J при центрифугировании/фильтрации
2-2	"	"
3-1	AMG 330 в 35 mM трис, 17,5 mM фосфат натрия, 50 mM аргинин, 1,4 трегалоза, 0,05% ПЭГ 4000, pH 6,0	2 мл A, замена буфера в K при центрифугировании/фильтрации
3-2	"	"
4-1	AMG 330 в 10 mM цитрате, 50 mM аргинин, 50 mM глутамин, 2% сахара, 4% маннитол, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0	2 мл A, замена буфера в L при центрифугировании/фильтрации
4-2	"	"
5-1	AMG 330 без замены буфера	110 мкл A в виалах ВЭЖХ
5-2	"	"

Начальная концентрация белка составляла 0,4 мг/мл. 2 мл 0,4 мг/мл AMG 330 помещали в 15-ти мл пробирку с фильтром Amicon ultra, MWCO (номинальное отсечение по молекулярной массе) 10000. 10 мл соответствующего буфера добавляли в каждую пробирку и осторожно смешивали с белком и центрифугировали (центрифуга Allegra 6R, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) в течение 3 ч при 2000 об/мин при 4°C. Затем ультраконцентрат осторожно смешивали и пробирки с фильтром центрифугировали в течение 1,5 ч при 2500 об/мин при 25°C. После получения объема ультраконцентрата 200-250 мкл, к каждому добавляли 10 мл соответствующего буфера и осторожно смешивали с ультраконцентратом, а затем центрифугировали в течение 30 мин при 2500 об/мин при 25°C до конечного объема 200-250 мкл. Конечная концентрация белка в 4 разных составах составляла от 2,9 до 3,7 мг/мл.

Аналитическая SEC: Образцы анализировали аналитической SEC (TSKgel G3000SWXL, 7,8 мм ID, PA, США) в хроматографической системе Agilent (Agilent 1200, Santa Clara, CA, USA) с подвижным буфером из 100 mM фосфата натрия, 250 mM хлорида натрия, pH 6,8 при скорости потока 0,5 мл/мин (общее время анализа: 35 мин/введение). Температура автосамплера поддерживалась на уровне 4°C во время хроматографического анализа.

Наличие SBE-β-CD, по-видимому, обеспечивает значительную защиту AMG 330 от образования ВММ во время концентрации белка ультрафильтрацией с самым низким относительным количеством агрегатов в составе, содержащем SBE-β-CD. Композиция, содержащая аргинин, глутамат, сахарозу, маннит и PS-80, имела наибольшее количество ВММ, за которым следует композиция, содержащая трис, фосфат, аргинин, трегалозу и ПЭГ 4000 (фиг. 11). Анализ CEX показал аналогичный эффект (данные не представлены).

Пример 9. Мелкомасштабные исследование композиции AMG 330, включая SBE-β-CD (LLPS, FT, UFC).

Целью этого эксперимента является оценка устойчивости AMG 330 после различных стрессов в 14 различных композициях. В частности, AMG 330 оценивали после LLPS, 20 циклов замораживания/размораживания (З/Р) и концентрирования ультрафильтрацией/центрифугированием (UFC). Как показано в примере 8, SBE-β-CD обеспечивает защиту от агрегации AMG 330 и дополнительно оценивается в этом эксперименте. Для UFC (фиг. 12 А, В) было исследовано только 5 композиций. Для исследований LLPS и З/Р (фиг. 12 С, D) было исследовано 14 композиций. Образцы LLPS анализировали аналитическим CEX, тогда как образцы UFC и З/Р анализировали как аналитическими SEC, так и CEX.

Материалы и методы.

Таблица 10. Приготовление стокового раствора

ID раствора	Композиция раствора	Приготовление раствора	Объем
А	20 mM цитрат, pH 6,0	во время среды	20 л
В	~ 2 мг/ AMG 330, замена буфера в А	диализ 0,4 мг/мл AMG 330, затем концентрация ультрафильтрацией/центрифугированием	20 мл, концентрация до 4 мл
С	1% полисорбат 80	1г, довести до 100г в А	100 мл

(масс/об) в А			
D	10% SBE-β-CD (об/об) в А, рН 6,0	5г довести до 50г в А, рН довести до 6,0	50 мл
E	15% глицин (об/об) в А, рН 6,0	7,5г довести до 50г в А, рН довести до 6,0	"
F	40% сахароза (об/об) в А, рН 6,0	10г довести до 25г в А	25 мл
G	14% маннитол (об/об) в А, рН 6,0	3,5г довести до 25г в А	"
H	400 мМ аргинин в А, рН 6,0	3,484г аргинина довести до 50г в А, рН довести до 6,0	50 мл
I	200 мМ аргинин, 200 мМ глутамин в А, рН 6,0	1,742г аргинина+1,471г глутамина довести до 50г в А, рН довести до 6,0	"
J	15% дигидрат трегалозы (об/об) в А	3,75г, довести до 25г в А	25 мл
K	26% ПЭГ 3350 (об/об) в А, рН 6,0 1,93 мг/ AMG	10,4г, довести до 40г в А, рН довести до 6,0	40 мл
L	330+0,074% полисорбат 80	2100 мкл В+168 мкл С	2268 мкл
M	40% SBE-β-CD (об/об) в А, рН 6,0	6г, довести до 15г в А, рН довести до 6,0	15 мл
N	55% сахароза в А	13,75г, довести до 25г в А	25 мл

Ультрафильтрация/центрифугирование (UFC).

Таблица 11. Подготовка образца к UFC (объем в мкл)

ID	Композиция образца	20 мМ цит	PS-80	Каптизол	Глицин	Сахароза
образца	А	С	Д	Е	Ф	
2-1 UFC	Контроль	79,2	0,8			
3-1 UFC	0,5% SBE-β-CD	75,2	0,8	4		
4-1 UFC	1% SBE-β-CD	71,2	0,8	8		
5-1 UFC	2% SBE-β-CD, 2% SBE-β-CD, 2%	63,2	0,8	16		
6-1 UFC	глицин, 1% сахароза	58,5	0,8	8	10,7	2
8-1 UFC	2% глицин, 1% сахароза	66,5	0,8		10,7	2

Для каждого образца, 4 мл 0,4 мг/мл AMG 330 помещали в пробирку с фильтром Amicon Ultra 15 мл MWCO (Отсечение по Молекулярной Массе) 10000. В каждую пробирку добавляли 8 мл соответствующего буфера и осторожно смешивали с белком и центрифугировали (центрифуга Allegra 6R, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) при 2000 об/мин (4000 g) при 20° С до тех пор, пока объем ультраконцентрата не составлял 200-250 мкл. Этот процесс повторяли два раза в общей сложности в течение 3 этапов концентрации. Затем ультраконцентрат перемешивали пипеттором, удаляли из фильтрационной пробирки, помещали в пробирку Eppendorf и микроцентрифугировали (центрифуга Eppendorf 5418, St. Louis, MO, USA) при максимальной скорости в течение 2 мин. После этого измеряли концентрацию белка супернатанта и анализировали аналитическим SEC (такое же описание, как в примере 8) путем введения 20 мкл. Каждый образец был подготовлен в двух повторностях.

LLPS.

Образцы готовили, как описано в таблице ниже, и инкубировали в течение 5 дней при 4°С. Конечный объем всех образцов составлял 240 мкл. После инкубации образцы подвергали микроцентрифугированию (центрифуга Eppendorf 5418, St.Louis, MO, USA) в течение 20 с, затем 200 мкл супернатанта удаляли для аналитического SEC (такое же описание, как в примере 7), за исключением того, что поддерживалась температура автосамплера при 25°С.

Таблица 12. Подготовка образца композиции для LLPS

Объем в мкл	Состав образца	AMG									
		20	330	40%	Гл	55%	Ман	Ар	Аргинин	Тр	ПЭГ
		цитрат, рН 6,0	мМ + Полисорбат 80	SBE-β-CD	иц ин	сахароза	нитол	гигин	ниглутамат	егалоза	
ID	Состав образца	A	L	M	E	N	G	H	I	J	K
1	Контроль, 0% ПЭГ	207,6	32,4								0
2	Контроль, 13% ПЭГ	87,6	32,4								0
3	0,5% SBE-β-CD, 13% ПЭГ	84,6	32,4	3							120
4	1% SBE-β-CD, 13% ПЭГ	81,6	32,4	6							120
5	2% SBE-β-CD, 13% PEG	75,6	32,4	12							120
6	1% глицин, 1% сахароза, 13% ПЭГ	45,2	32,4	6	32	4,4					120
7	4% глицин, 13% ПЭГ	23,6	32,4		64						120
8	2% глицин, 1% сахароза, 13% ПЭГ	51,2	32,4		32	4,4					120
9	4% маннитол, 13% ПЭГ	19	32,4				68,6				120
10	100 мМ аргинин, 13% ПЭГ	27,6	32,4					60			120
11	50 мМ аргинин, 50 мМ глутамат, 13% ПЭГ	27,6	32,4						60		120
12	4% сахароза, 13% ПЭГ	70,1	32,4			17,5					120
13	4% дегидрат трегалозы, 13% ПЭГ	23,6	32,4							64	120
14	1% SBE-β-CD, 4% сахароза, 13% ПЭГ	64,1	32,4	6		17,5					120
15	1% SBE-β-CD, 4% маннитол, 2% сахароза, 13% ПЭГ	4,3	32,4	6		8,7	68,6				120

Увеличение концентрации SBE-β-CD привело к увеличению извлечения мономера при сохранении относительно низкого уровня агрегатов. SBE-β-CD действовал еще лучше, когда он сочетался с сахарозой, маннитолом и сахарозой, и особенно с глицином и сахарозой. Это особенно бросается в глаза, потому что только глицин действовал довольно плохо, и он не намного лучше сочетался с сахарозой.

Замораживание/размораживание (З/Р).

Таблица 13. Приготовление композиции образца для З/Р

Объем в мкл		20 мМ	AMG	40%	Глицин	55%	Маннитол	Аргинин	Трегалоза
		цитрат, pH 6,0	330 + Полисорбат 80	SBE- β -CD		сахароза		глютама	
ID	Состав образца	A	L	M	E	N	G	I	J
1	Контроль, -70°C	207,6	32,4						
2	Контроль, -30°C	207,6	32,4						
3	0,5% SBE- β -CD, -70°C	204,6	32,4	3					
4	0,5% SBE- β -CD, -30°C	204,6	32,4	3					
5	1% SBE- β -CD, -70°C	201,6	32,4	6					
6	1% SBE- β -CD, -30°C	201,6	32,4	6					
7	2% SBE- β -CD, -70°C	195,6	32,4	12					
8	2% SBE- β -CD, -30°C	195,6	32,4	12					
9	1% SBE- β -CD, 2% глицин, 1% сахароза, -70°C	165,2	32,4	6	32	4,4			
10	1% SBE- β -CD, 2% глицин, 1% сахароза, -30°C	165,2	32,4	6	32	4,4			
11	4% глицин, -70°C	143,6	32,4		64				
12	4% глицин, -30°C	143,6	32,4		64				
13	2% глицин, 1% сахароза, -70°C	171,2	32,4		32	4,4			
14	2% глицин, 1% сахароза, -30°C	171,2	32,4		32	4,4			
15	4% маннитол, -70°C	139	32,4				68,6		
16	4% маннитол, -30°C	139	32,4				68,6		
17	50 мМ аргинин, 50 мМ глутамат, -70°C	147,6	32,4					60	
18	50 мМ аргинин, 50 мМ глутамат, -30°C	147,6	32,4					60	
19	4% дегидрат трегалозы, -70°C	143,6	32,4						64
20	4% дегидрат трегалозы, -30°C	143,6	32,4						64
21	1% SBE- β -CD, 4% сахароза, -70°C	184,1	32,4	6		17,5			
22	1% SBE- β -CD, 4% сахароза, -30°C	184,1	32,4	6		17,5			
23	1% SBE- β -CD, 4% маннитол, 2% сахароза, -70°C	124,3	32,4	6		8,7	68,6		
24	1% SBE- β -CD, 4% маннитол, 2% сахароза, -30°C	124,3	32,4	6		8,7	68,6		

Образцы были подготовлены в соответствии с таблицей выше. Выполняли 20 циклов З/Р с образцами, хранящимися по крайней мере час при -70 или -30°C во время каждого замораживания, и при комнатной температуре не более одного часа во время размораживания. Конечный объем каждого образца составлял 240 мкл. Аликвоты удаляли для аналитического анализа SEC (аналогично примеру 8) после 0 и 20 циклов.

Наличие SBE- β -CD, по-видимому, дает преимущество для снижения агрегации и увеличения относительных уровней мономера во время З/Р по сравнению с другими препаратами. Композиции, в которых SBE- β -CD использовали в комбинации с другими эксципиентами, также хорошо действовали, особенно с глицином и сахарозой.

Пример 10. Сравнение эффектов SBE- β -CD и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина.

Как было показано в предыдущем эксперименте UFC, SBE- β -CD обеспечивает значительную защиту AMG 330 от агрегации во время концентрирования белка. В данном эксперименте влияние на AMG 330 при концентрировании белка UFC сравниваются в присутствии либо SBE- β -CD, либо другого циклодекстрина, 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина (2-HP- β -CD).

Материалы и методы.

20 мл 0,4 мг/мл AMG 330 концентрировали до ~10 мл в пробирках с фильтром Amicon Ultra 15 мл MWCO 10000. Ультракonzентрат пробирок объединяли и концентрацию белка затем измеряли с помощью SoloVPE (с использованием коэффициента экстинкции 2,319 мл/(мг·см)) и определили как 0,83 мг/мл. Затем этот белок был использован при приготовлении образцов для UFC.

Все образцы содержали 10 mM фосфата калия, 8% сахарозу, 0,01% полисорбата-80, pH 6,0.

Были протестированы пять характеристик образцов: 1) контроль только с использованием буфера, 2) с добавлением 1% SBE- β -CD, 3) с добавлением 2% SBE- β -CD, 4) 1% 2-HP- β -CD и 5) с добавлением 2% 2-HP- β -CD. Было приготовлено 50 мл каждого из 5 буферов. Образец каждый композиции испытывали в двух повторностях.

Для каждого образца 0,875 мл AMG 330 помещали в пробирку с фильтром Amicon Ultra объемом 4 мл с MWCO 10000. В каждую пробирку добавляли 3,125 мл соответствующего буфера и осторожно смешивали с белком, и пробирки с фильтром центрифугировали (центрифуга Allegra 6R, Beckman Coulter, Brea, CA, США) при центробежном ускорении 4000 g при 25°C , пока объем ультракonzентрата не превышал 100 мкл. Добавляли 4 мл дополнительного буфера и образцы снова концентрировали до ~100 мкл. Ультракonzентрат затем осторожно перемешивали пипеттором, и 45 мкл удаляли из фильтровальной пробирки, помещали в пробирку Eppendorf и микроцентрифугировали (центрифуга Эппендорфа 5418, Сент-Луис, Миссури, США) с максимальной скоростью в течение 2 мин. Супернатант анализировали аналитической SEC (так же, как в примере 8). Неконцентрированный AMG 330 (0,4 мг/мл) также анализировали для сравнения.

В этом эксперименте, AMG 330 концентрировали до ~10 мг/мл в присутствии 1 и 2% SBE- β -CD или 2-HP- β -CD. Композиции, содержащие SBE- β -CD, обозначены звездочками. Контроль слева (обозначенный как 0,4 мг/мл) не концентрировали выше уровня, начиная с концентрации 0,4 мг/мл. Второй слева (обозначенный как Контроль на фиг. 4а и 4b) представляет собой образец, который был сконцентрирован без какого-либо циклодекстрина. Сравнение составов SBE- β -CD и 2-HP- β -CD показало преимущество использования SBE- β -CD. На фиг. 13 показана максимальная достигнутая концентрация. На фиг. 14 показан состав этих концентрированных растворов в пересчете на % агрегата и % мономера.

Пример 11. Сравнение эффектов четырех различных циклодекстринов на их способность поддерживать AMG 330 в растворимой неагрегированной форме.

В предыдущих экспериментах было показано, что SBE- β -CD уменьшает агрегацию в AMG 330. Целью этого эксперимента является оценка других циклодекстринов по сравнению с SBE- β -CD. Уровни агрегации в AMG 330 измеряли после 1-4 дней инкубации при 4 и 25°C с 4 различными циклодекстринами.

Материалы и методы.

Все образцы также содержали 2 мг/мл AMG 330, 20 mM цитрат и 0,01% полисорбат-80, pH 6,0. Образцы готовили и хранили в пробирках Eppendorf (табл. 14). Пробирки были завернуты в пластик и защищены от света во время инкубации. Аликвоты были взяты после инкубации в течение 1 и 4 дней при 4°C и 25°C (ThermoFisher Scientific, (Newington, NH) Naake A28). Аликвоты центрифугировали некоторое время в микро центрифуге (центрифуга Eppendorf 5418, St.Louis, MO, USA), и супернатанты анализировали аналитической SEC.

Таблица 14. Композиция образца и приготовление

ID раствора	Состав раствора	Приготовление раствора	Объем
A	2 мг/мл AMG 330	НЕ ПРИМЕНЯЛОСЬ	500 мкл
B.	20 mM цитрат, pH 6,0	НЕ ПРИМЕНЯЛОСЬ	
C	10% SBE- β -CD в B	1,0 г, довести до	

			10 г в В		
D	10% альфа-циклодекстрин (α -CD) в В	1,0 г, довести до 10 г в В		10 мл	
E	10% гамма-циклодекстрин (γ -CD) в В	1,0 г, довести до 10 г в В		10 мл	
F	10% 2-гидроксипропил- бета-циклодекстрин (2-HP- β -CD) в В	1,0 г, довести до 10 г в В		10 мл	
G	1% аолисорбат-80 в В	НЕ ПРИМЕНЯЛОСЬ			
H	2 мг/мл AMG 330+0,01% полисорбат-80	495 мкл А+5 мкл G		500 мкл	

Таблица 15. Композиция образца и приготовление

ID Образца	Состав образца	Приготовление образца	Объем	Объем аликвоты	Температ ура хранения (С)
Контроль при 4°C	Контроль	95 мкл Н+ 5 мкл В	100 мкл	50 мкл	4С (холодиль- ник)
Контроль при 25°C	Контроль	95 мкл Н+ 5 мкл В	100 мкл	50 мкл	25С (термост ат)
0,5% SBE- β -CD при 4°C	0,5% SBE- β -CD	95 мкл Н+ 5 мкл С	100 мкл	50 мкл	4С (холодиль- ник)
0,5% SBE- β -CD при 25°C	0,5% SBE- β -CD	95 мкл Н+ 5 мкл С	100 мкл	50 мкл	25С (термост ат)
0,5% α -CD при 4°C	0,5% α -CD	95 мкл Н+ 5 мкл D	100 мкл	50 мкл	4С (холодиль- ник)
0,5% α -CD при 25°C	0,5% α -CD	95 мкл Н+ 5 мкл D	100 мкл	50 мкл	25С (термост ат)
0,5% γ -CD при 4°C	0,5% γ -CD	95 мкл Н+ 5 мкл E	100 мкл	50 мкл	4С (холодиль- ник)
0,5% γ -CD при 25°C	0,5% γ -CD	95 мкл Н+ 5 мкл E	100 мкл	50 мкл	25С (термост ат)
0,5% 2-HP- β -CD при 4°C	0,5% 2-HP- β - CD	95 мкл Н+ 5 мкл F	100 мкл	50 мкл	4С (холодиль- ник)
0,5% 2-HP- β -CD при 25°C	0,5% 2-HP- β - CD	95 мкл Н+ 5 мкл F	100 мкл	50 мкл	25С (термост ат)

Четыре различных циклодекстрина, включая SBE- β -CD, испытывали на способность поддерживать AMG 330 в растворимой неагрегированной форме. Белок при ~2 мг/мл инкубировали в течение 4 дней при 4 и 25°C без дополнительного концентрирования. Все образцы также содержали 20 мМ цитрат и 0,01% полисорбата-80, pH 6,0.

В конце 4 дней при 4°C, состав 0,5% SBE- β -CD имел более высокую общую площадь пика SEC, что указывает на более высокую концентрацию растворимых белков. Другие составы осаждались и агрегировались в различной степени. Этот результат показывает, что SBE- β -CD является более эффективным стабилизатором и солюбилизатором AMG 330 при обеих температурах (4° и 25°C) по сравнению с α -циклодекстрином, γ -циклодекстрином или гидроксипропил β -циклодекстринами, которые как-будто лучше при 25°C (фиг. 15).

Пример 12. AMG 330 в 13 различных композициях при 1 мг/мл и хранением при -20, -30 и -70°C до 6 недель.

Целью этого эксперимента является разработка стабильной замороженной и лиофилизированной композиции для AMG 330 SBE- β -CD, и Triton X-100 оценивали в качестве наполнителя композиции. Поликарбонатные бутылки будут использоваться в моделированном хранении фармацевтической субстанции (DS) при замораживании.

Материалы и методы.

С исходной концентрацией 0,4 мг/мл для AMG 330, буфер обмена UF/DF (буферы, перечисленные в табл. 16) проводили с использованием двух прозрачных μ Scale TFF-систем с дельта-давлением, установленным на уровне ~23 psi. Использовались четыре кассеты Millipore Pellicon 3 Ultracel 10 kD 0,11 м² и два сборных насосно-компрессорных узла. После обмена материал переконцентрировался до 1,2 мг/мл и собирался в стерильных контейнерах Nalgene.

Таблица 16. Состав композиции

ID образца	Аббревиатура композиции	Состав композиции
КО 1 (компов.1)	C60CpGSuP	10 мМ цитрат, 1% SBE- β -CD, 2% глицин, 1% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 2	C60CpMSuP	10 мМ цитрат, 1% SBE- β -CD, 4% маннитол, 2% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 3	C60CpSuP	10 мМ цитрат, 1% SBE- β -CD, 8% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 4	H60CpGSuP	10 мМ гистидин, 1% SBE- β -CD, 2% глицин, 1% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 5	H60CpMSuP	10 мМ гистидин, 1% SBE- β -CD, 4% маннитол, 2% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 6	H60CpSuP	10 мМ гистидин, 1% SBE- β -CD, 8% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 7	KP60CpGSuP	10 мМ фосфат калия, 1% SBE- β -CD, 2% глицин, 1% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 8	KP60CpMSuP	10 мМ фосфат калия, 1% SBE- β -CD, 4% маннитол, 2% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 9	KP60CpSuP	10 мМ фосфат калия, 1% SBE- β -CD, 8% сахараза, 0,01% полисорбат 80, pH 6,0
КО 10	KP60CpGSuT	10 мМ фосфат калия, 1% SBE- β -CD, 2% глицин, 1% сахараза, 0,004% Triton X-100, pH 6,0
КО 11	KP60CpMSuT	10 мМ фосфат калия, 1% SBE- β -CD, 4% маннитол, 2% сахараза, 0,004% Triton X-100, pH 6,0
КО 12	KP60CpSuT	10 мМ фосфат калия, 1% SBE- β -CD, 8% сахараза, 0,004% Triton X-100, pH 6,0
КО 13	ПЭГ 4000	35 мМ Трис, 17,5 мМ фосфат натрия, 50 мМ аргинин, 1,4% трегалоза, 0,05% ПЭГ 4000 при pH 6,0.

Буфер для композиции, ПЭГ и стоковые поверхностно-активные вещества были свежеприготовлены и добавлены для получения конечного материала композиции. Образцы доводились до объема 15 мл в 30 мл ПК-бутылках (Nalgene) для этого эксперимента. Все образцы фильтровали в стерильном колпаке с использованием блок-фильтров Sterivex (0,22 мкм) перед наполнением. Конечная концентрация белка в ПК-бутылках составляет 1 мг/мл.

В стационарных экспериментах, образцы измеряли посредством аналитической SEC (аналогично примеру 8) при t=0 и t=6 недель.

Результаты.

SBE- β -CD включали в композиции AMG 330, которые инкубировали при различных температурах. Результаты после 6 недель хранения показали, что все композиции, содержащие SBE- β -CD, были стабильными в отличие от композиции на основе использования ПЭГ-4000 и без SBE- β -CD.

Сравнение между композицией на основе SBE- β -CD и ПЭГ демонстрирует преимущество использования SBE- β -CD. Композиция на основе ПЭГ агрегируется и осаждается в значительной степени после хранения при -20°C (фиг. 16).

Пример 13. Оценка двух циклодекстранов (SBE- β -CD и α -циклодекстрина) в качестве наполнителей для лиофилизированной композиции для AMG 330.

Этот эксперимент был проведен для определения носителя лиофилизированной композиции, который может быть разработан для молекул ViTE®. В качестве модельного белка использовался AMG 330 ViTE®. Два циклодекстрина (SBE- β -CD и α -циклодекстран) оценивали как наполнители композиции.

Материалы и методы.

Концентрация лекарственного вещества AMG 330 составляет 0,4 мг/мл. В AMG 330 буфер заменяли на соответствующие буферы (перечисленные в табл. 17) с использованием Millipore Centriprep (номинальный предел молекулярной массы (NMWL) 30000, 15 мл).

1) Аликвотированная по 30 мл DS (фармацевтическая субстанция) AMG 330 делилась на два (2×15 мл) контейнера Centriprep для образцов на композицию.

2) Добавляли 4,4 мл соответствующего буфера для композиции в каждый фильтрационный собиратель Centriprep (чтобы предотвратить чрезмерную концентрацию DS).

3) Центрифугировали (центрифуга Allegra 6R, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) при 1500xg в течение 20 мин при 25°C (центрифугировали до равновесного состояния); ~5 мл белка оставалось в каждом контейнере для образцов, 3-кратная концентрация до целевых 1,2 мг/мл.

4) Фильтрат декантировали в каждом фильтрационном собирателе и заменяли на 4,4 мл свежего буфера для композиции; в каждый контейнер для образцов добавляли 10 мл свежего буфера композиции.

5) Центрифугировали как на этапе 3.

6) Этапы 4-5 повторяли еще четыре раза (пять общих замен буфера, ~243-кратное суммарное разведение).

7) Материал с замененным буфером хранили всю ночь при 4°C.

Таблица 17. Компоненты композиции для лиофилизации

ID образца	Концентрация композиции (мг/мл)	Буфер	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество	pH
C60SuT	0,85	20 мМ цитрат	4% (масс/об) сахароза	0,01% (масс/об) полисорбат 80	6
C60GSuT	0,85	20 мМ цитрат	2% (масс/об) глицин, 1% (масс/об)	0,01% (масс/об) полисорбат80	6
C60M SuT	0,85	20 мМ цитрат	4% маннитол, 2% (масс/об)	0,01% (масс/об) полисорбат 80	6
C60RSuT	0,85	20 мМ цитрат	75 мМ аргинин, 4% (масс/об) сахароза	0,01% (масс/об) полисорбат80	6
C60CpT	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) SBE- β -CD	0,01% (масс/об) полисорбат80	6
C60CpSuT	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) SBE- β -CD, 4% (масс/об)	0,01% (масс/об) полисорбат80	6
C60CpGSuT	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) SBE- β -CD, 2% (масс/об) глицин, 1% (масс/об)	0,01% (масс/об) полисорбат80	6

C60CpM SuT	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) SBE-β-CD, 4% (масс/об) маннитол, 2% (масс/об)	0,01% (масс/об) полисорбат80	6
C60A cL	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) α-	0,01% (масс/об) Lutrol F68	6
C60A cSuL	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) α- циклодекстрин	0,01% (масс/об) Lutrol F68	6
C60AcGSuL	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) α- циклодекстрин, 2% (масс/об) глицин, . 1%	0,01% (масс/об) Lutrol F68	6
C60A cM SuL	0,85	20 мМ цитрат	0,5% (масс/об) α- циклодекстрин, 4% (масс/об) маннитол, 2% (масс/об) сахароза	0,01% (масс/об) Lutrol F68	6

Буфер композиции и стоковые поверхностно-активные вещества добавляли для получения конечного готового материала. Образцы доводили до объема 2 мл в стеклянных флаконах по 5 см куб. (Schott Type 1A) с общим количеством 4 флакона на композицию. Все образцы фильтровали в стерильном колпаке с использованием блок-фильтров Sterivex (0,22 мкм) перед наполнением. После заполнения, флаконы были неплотно закрыты резиновыми пробками для лиофилизации (фиг. 17A).

Три флакона на композицию лиофилизировали с использованием модифицированного консервативного цикла лиофилизации (температура отжига -17°C, общее время цикла 66 часов). Оставшийся один флакон на композицию зарезервировали для анализа t=0 (до лиофилизации). До растворения, лиофилизированные осадки визуально проверялись на предмет структурной целостности и однородности. Лيوфилизированные образцы растворяли в 1,96 мл воды Milli-Q и осторожно перемешивали до полного растворения для дальнейшего анализа. Образцы до лиофилизации и после растворения анализировали посредством аналитической SEC и режима микропотоковой визуализации (MFI).

Результаты SEC показали, что композиции, содержащие SBE-β-CD, генерируют более низкие уровни видов ВММ до и после лиофилизации по сравнению с препаратами с α-циклодекстраном или вообще без циклодекстрана. Другие наполнители композиции (сахароза, глицин, маннитол), по-видимому, значительно не влияли на уровни видов ВММ (фиг. 17B, C).

MFI выявил умеренное увеличение количества невидимых невооруженным глазом частиц (большинство в диапазоне 1-2 мкм) для большинства композиций после лиофилизации. Резкое увеличение наблюдалось для одной из композиций α-циклодекстрана, C60AcL. Две композиции, содержащие SBE-β-CD (каптизол), C60CpT и C60CpMSuT, содержали наименьшее количество невидимых невооруженным глазом частиц после лиофилизации (фиг. 17D).

Пример 14. Мелкомасштабные исследование композиции Far alpha BiTE®, включая SBE-β-CD и α-циклодекстан (UFC, LLPS и З/Р).

Целью этого эксперимента является оценка стабильности Far alpha BiTE® после различных стрессов в различных композициях. В частности, FAP alpha BiTE® (SEQ ID NO: 177) оценивали после LLPS, 20 циклов замораживания/размораживания (З/Р) и концентрации ультрафильтрацией/центрифугированием (UFC). Результаты предыдущих исследований с аналогичными препаратами показали, что SBE-β-CD положительно влияет на стабильность AMG 330 BiTE®, и в этом исследовании было исследовано влияние на SBE-β-CD на FAP BiTE®.

Материалы и методы.

Для каждой тестируемой композиции готовили 30 мл буфера.

Таблица 18. Образец композиции и приготовление: контроль (K01)
приготовлен в 10 мМ фосфате калия, 161 мМ аргинина, pH 7,6+4%
трегалоза в концентрации 2,65 мг/мл

		1%	1%	40%	10%	15%	55%	18%
	20 мМ	Поли						
Объем в мл	цитра	сorb	F-68	SBE-	α-CD	Глиц	Саха	Ман
	та	ат-		β-CD		ин	роза	нит
		80						ол
ID	Состав образца							

Образца

		не	не	не	не	не	не	не	не
		приме	прим	прим	прим	прим	прим	прим	прим
		нялос	енял	енял	енял	енял	енял	енял	енял
		ь	ось	ось	ось	ось	ось	ось	ось
K01	Контроль								не
									при
									мен
									яло
									сь
K02	Контроль, 0,01% полисорбат 80	29,7	0,3						
K03	0,5% SBE-β-CD, 0,01% полисорбат-80	29,32 5	0,3		0,37 5				
K04	0,5% SBE-β-CD, 2% глицин, 1% сахараза, 0,01% полисорбат-80	24,78	0,3		0,37 5		4	0,54 5	
K05	0,5% SBE-β-CD, 4% маннитол, 2% сахараза, 0,01% полисорбат-80	21,56 5	0,3		0,37 5			1,09	6,6 7
K06	0,5% α-CD, 0,1% F-68	25,5		3		1,5			
K07	0,5% α-CD, 2% глицин, 1% сахараза, 0,1% F-68	20,95 5		3		1,5	4	0,54 5	
K08	0,5% α-CD, 4% маннитол, 2% сахараза, 0,1% F-68	7,74		3		1,5		1,09	6,6 7

Для каждого образца, 375 мкл 2,65 мг/мл FAP альфа BiTE® (приготовленный в 10 мМ фосфате калия, 161 мМ аргинине, pH 7,6+4% трегалоза) помещали в пробирку с фильтром Amicon Ultra 4 MWCO 10000. В каждую пробирку добавляли 3,5 мл соответствующего буфера и смешивали с белком, и пробирки центрифугировали (центрифуга Allegra 6R, Beckman Coulter, Brea, CA, США) при 4000 g при 25°C, пока объем ультраконцентрата не превышал 50 мкл. Этапы добавления буфера и центрифугирования повторяли два раза в общей сложности на 3-х этапах концентрирования. Затем ультраконцентрат осторожно смешивали пипеттором, удаляли из пробирки с фильтром, помещали в пробирку Eppendorf и микроцентрифугировали (центрифуга Eppendorf 5418, St.Louis, MO, USA) с максимальной скоростью в течение 2 мин. Супернатант затем анализировали при помощи SEC. Каждый образец был подготовлен в двух повторях. Неконцентрированный FAP альфа BiTE® (2,65 мг/мл) также анализировали для сравнения.

Присутствие SBE-β-CD, по-видимому, увеличивало относительный главный пик определяемого компонента в SEC, подавляя образование видов ВММ во время концентрации белка. Присутствие α-циклодекстрана приводило к очень низкому восстановлению белка и высоким относительным уровням видов ВММ.

Результаты Fap alpha LLPS: Результаты LLPS с Fap a BiTE® и SBE-β-CD сопоставимы с результатами LLPS с AMG 330. α-циклодекстран не оказывал никакого положительного или отрицательного влияния на коллоидную стабильность этой молекулы (фиг. 18).

Пример 15. Исследование композиции для конструктора антитела CD33-scFc BiTE.

Конструктор антитела CD33-scFc BiTE очищали с использованием белка А и катионообменной хроматографии (СЕХ). Элюат СЕХ диализировали в 10 мМ буфере L-глутаминовой кислоты при pH 4,2 с использованием кассет для диализа, содержащих мембраны с номинальной отсечкой по молекулярной массе (MWCO) 10 кДа. Диализ проводили при 2-8°C. Концентрация диализированного продукта составляла 2,3 мг/мл. Материал дополнительно концентрировали с помощью ультрафильтрационного центрифугирования (UFC) с использованием концентраторов, содержащих мембраны с MWCO 10 кДа. Концентрированный материал фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Концентрация после фильтрации составляла 2,7 мг/мл. Материал полностью готовили в соответствии с композициями, перечисленным в табл. 19, посредством соединения со стоковыми растворами. Конечная концентрация белка составляет 1,0 мг/мл.

Таблица 19. Общие сведения о тестируемых композициях;
HPBCD: гидроксипропил-бета-циклодекстрин; PS 80: полисорбат 80

Название	L-глута-	Маннитол	Сахароза	Дигидрат	HPBCD	PS 80
	миновая	[% (масс/об)]	[% (масс/об)]	трегалозы [% (масс/об)]	[% (масс/об)]	[% (масс/об)]
	кислота [мМ]					
G42MSuT	10	4,0	2,0	0,0	0,0	0,01
G42MTrT	10	4,0	0,0	2,0	0,0	0,01
G42SuT	10	0,0	8,0	0,0	0,0	0,01
G42TrT	10	0,0	0,0	8,0	0,0	0,01
G42HP12SuT	10	0,0	4,0	0,0	12,0	0,01
G42HP12TrT	10	0,0	0,0	4,0	12,0	0,01
G42HP6MT	10	4,0	0,0	0,0	6,0	0,01
G42HP6SuT	10	0,0	6,0	0,0	6,0	0,01
G42HP6TrT	10	0,0	0,0	6,0	6,0	0,01

Композиции заполняли до 1,0 мл в стеклянных флаконах 2R типа I, которые закрывали бутылкаучковыми пробками и алюминиевыми колпачками. Флаконы хранили при -20 и -70°C. Образцы доставали в определенные моменты времени. После отбора проб, флаконы размораживали при комнатной температуре и анализировали с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) с количественной оценкой процентного содержания высокомолекулярных соединений. SE-UPLC проводили на системе UPLC Aquity H-Class (Waters), используя колонку Acquity UPLC BEH200 SEC 150 мм (Waters). Температуру колонки устанавливали равной 25°C. Разделение вариантов по размеру достигалось применением изократического способа со скоростью подвижной фазы 0,4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl, pH 6,8. Общее время записи хроматограммы составляет 6,0 мин. Образцы выдерживали при 8°C в автосамплере до анализа. Суммарное количество введенного белка 3 мкг. Во избежание загрязнения проб, после каждого образца проводили промежуточные введения 40% ACN (ацетонитрила). Детектирование основывалось на флуоресценции (возбуждение при 280 нм, эмиссия при 325 нм). Интегрирование пиков выполнялось с использованием программного обеспечения Empower®. Отмечалась относительная площадь под кривой ВММС (фиг. 18).

Хранение готовой композиции конструктора антитела CD33-scFc BiTE при -70°C или ниже ингибировало образование ВММС. Тем не менее, ВММС значительно увеличились при хранении при -20°C для композиций, которые не содержали HPBCD. В отличие от этого, белок предохраняли от образования ВММС при -20°C в присутствии HPBCD независимо от его концентрации (6 или 12%). Присутствие маннитола отрицательно сказалось на стабильности при -20°C, что было отмечено увеличением ВММС.

Пример 16. Исследование композиции для конструктора антитела FLT3-scFc BiTE.

Две различных композиции конструктора антител FLT3-scFc BiTE (FL1-scFc и FL2-scFc) очищали с использованием хроматографии на белке А и СЕХ. После СЕХ все конструкторы подвергали диафильтрации в буфере, состоящем из 10 мМ L-глутаминовой кислоты, 4% (мас./об.) сахарозы при pH 4,2. MWCO используемой мембраны составляла 10 кДа. Диафильтратный продукт (концентрация белка 1,7 мг/мл) концентрировали с помощью ультрафильтрации (MWCO 10 кДа) до достижения концентрации 7,6 мг/мл. Затем материал фильтровали через фильтр 0,2 мкм и полностью составляли путем соединения со стоковыми растворами наполнителей. Обзор композиций представлен в табл. 20.

Таблица 20. Общие сведения о тестируемых композициях;
pH довели до 4,2 для всех композиций;

HPBCD: гидроксипропил-бета-циклодекстрин; PS 80: полисорбат 80

Название	Белок	L-глутаминовая	Сахароза	HPBCD	PS 80
	[мг/мл]	кислота [мМ]	[% (мас/об)]	[% (мас/об)]	[% (мас/об)]
G42SuT	5,0	10	9,0	0,0	0,01
G42HP12SuT	5,0	10	4,0	12,0	0,01

Обе композиции заполняли до 1,3 мл в стеклянных флаконах 2R типа I, которые закрывали бутылкаучковыми пробками и алюминиевыми колпачками. Флаконы хранили при -20°C. Образцы доставали в определенные моменты времени. После отбора проб, флаконы размораживали при комнатной температуре и анализировали с помощью эксклюзионной ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) с количественной оценкой процентного содержания высокомолекулярных соединений. SE-UPLC проводили на системе UPLC Aquity H-Class (Waters), используя колонку Acquity UPLC BEH200 SEC 150 мм (Waters). Температуру колонки устанавливали равной 25°C. Разделение вариантов по размеру достигалось применением изократического способа со скоростью подвижной фазы 0,4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl, pH 6,8. Общее время

записи хроматограммы составляет 6,0 мин. Образцы выдерживали при 8°C в автосамплере до анализа. Суммарное количество введенного белка 3 мкг. Во избежание загрязнения проб, после каждого образца проводили промежуточные введения 40% ACN (ацетонитрила). Детектирование основывалось на флуоресценции (возбуждение при 280 нм, эмиссия при 325 нм). Интегрирование пиков выполнялось с использованием программного обеспечения Empower®. Отмечалась относительная площадь под кривой ВММС (фиг. 19).

Пример 17. Исследование композиции конструкторов антител ВСМА-scFc BiTE.

Два конструктора антител ВСМА-scFc BiTE (BC1-scFc и BC2-scFc) очищали, формировали, хранили и анализировали, как описано в примере 16. Общие сведения о композициях представлены в табл. 21.

Таблица 21. Общие сведения о тестируемых композициях; pH довели до 4,2 для всех композиций;

HPBCD: гидроксипропил-бета-циклодекстрин; PS 80: полисорбат 80

Исходный раствор: 100 мл раствора, содержащего 10 мг белка, 10 мм L-глутаминовой кислоты, 9 мм сахара, 0 мм HPBCD и 0,01 мм PS 80					
Название	Белок [мг/мл]	L- глутаминовая кислота [мм]	Сахароза [% (мас/об)]	HPBCD [% (мас/об)]	PS 80 [% (мас/об)]
G42SuT	5,0	10	9,0	0,0	0,01
G42HP12SuT	5,0	10	6,0	6,0	0,01

На фиг. 20 показано процентное содержание ВММС в зависимости от состава для обоих конструкторов антител. Процентное содержание ВММС увеличилось на 1,6% (BC1-scFc) и 1,9% (BC-scFc) соответственно в композициях, свободных от HPBCD, через четыре недели. В отличие от этого, образование ВММС ингибировалось в препаратах, содержащих 6% HPBCD.

SEQ ID NO:	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1.	CD3_1 VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
2.	CD3_1 VL CDR2	GTKFLAP
3.	CD3_1 VL CDR3	ALWYSNRWV
4.	CD3_1 VH CDR1	IYAMN
5.	CD3_1 VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKS
6.	CD3_1 VH CDR3	HGNFGNSYVSFFAY EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN IYAMNWVRQAPGKGLEW
7.	CD3_1 VH	VARIIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGT LTVVSS QTVVTQEP SLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPR
8.	CD3_1 VL	GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN IYAMNWVRQAPGKGLEW VARIIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGT LTVVSSGGGSGGGSGGGGSQ
9.	CD3_1 scFv	TVVTQEP SLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
10.	CD3_2 VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
11.	CD3_2 VL CDR2	GTKFLAP
12.	CD3_2 VL CDR3	ALWYSNRWV
13.	CD3_2 VH CDR1	KYAMN
14.	CD3_2 VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
15.	CD3_2 VH CDR3	HGNFGNSYISYWAY EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEW
16.	CD3_2 VH	VARIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LTVVSS QTVVTQEP SLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPR
17.	CD3_2 VL	GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEW VARIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LTVVSSGGGSGGGSGGGGSQ
18.	CD3_2 scFv	TVVTQEP SLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
19.	CD3_3 VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
20.	CD3_3 VL CDR2	GTKFLAP
21.	CD3_3 VL CDR3	ALWYSNRWV
22.	CD3_3 VH CDR1	SYAMN
23.	CD3_3 VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
24.	CD3_3 VH CDR3	HGNFGNSYLSFWAY
25.	CD3_3 VH	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFN SYAMNWVRQAPGKGLEW

			VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGT LVTVSS QTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFN SYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
26.	CD3_3	VL	
27.	CD3_3	s cFv	
28.	CD3_4	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
29.	CD3_4	VL CDR2	GTKFLAP
30.	CD3_4	VL CDR3	ALWYSNRWV
31.	CD3_4	VH CDR1	RYAMN
32.	CD3_4	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
33.	CD3_4	VH CDR3	HGNFGNSYLSYFAY EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGT LVTVSS QTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
34.	CD3_4	VH	
35.	CD3_4	VL	
36.	CD3_4	s cFv	
37.	CD3_5	VL CDR1	RSSTGAVTSGYYPN
38.	CD3_5	VL CDR2	ATDMRPS
39.	CD3_5	VL CDR3	ALWYSNRWV
40.	CD3_5	VH CDR1	VYAMN
41.	CD3_5	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKK
42.	CD3_5	VH CDR3	HGNFGNSYLSWWAY EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN VYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGT LVTVSS QTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPR GLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN VYAMNWVRQAPGKGLEW
43.	CD3_5	VH	
44.	CD3_5	VL	
45.	CD3_5	s cFv	

			VARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG LIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
46.	CD3_6	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
47.	CD3_6	VL CDR2	GTKFLAP
48.	CD3_6	VL CDR3	ALWYSNRWV
49.	CD3_6	VH CDR1	KYAMN
50.	CD3_6	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKS
51.	CD3_6	VH CDR3	HGNFGNSYTSYYAY EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW
52.	CD3_6	VH	VARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLTVTVSS QTVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPR
53.	CD3_6	VL	GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
54.	CD3_6	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
55.	CD3_7	VL CDR1	RSSTGAVTSGYYPN
56.	CD3_7	VL CDR2	ATDMRPS
57.	CD3_7	VL CDR3	ALWYSNRWV
58.	CD3_7	VH CDR1	GYAMN
59.	CD3_7	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKE
60.	CD3_7	VH CDR3	HRNFGNSYLSWFAY EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW
61.	CD3_7	VH	VARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHRNFGNSYLSWFAYWGQGLTVTVSS QTVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPR
62.	CD3_7	VL	GLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHRNFGNSYLSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG LIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
63.	CD3_7	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHRNFGNSYLSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG LIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NRWVFGGGTKLTVL
64.	CD3_8	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN

65.	CD3_8	VL CDR2	GTKFLAP
66.	CD3_8	VL CDR3	ALWYSNRWV
67.	CD3_8	VH CDR1	VYAMN
68.	CD3_8	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKK
69.	CD3_8	VH CDR3	HGNFGNSYISWWAY
			EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVIYAMNWVRQAPGKGLEW
70.	CD3_8	VH	VARIIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
			VYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGTTLTVSS
			QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPR
71.	CD3_8	VL	GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWY
			SNRWVFGGGTKLTVL
			EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVIYAMNWVRQAPGKGLEW
			VARIIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
			VYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ
72.	CD3_8	scFv	TVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRG
			LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS
			NRWVFGGGTKLTVL
73.	CD3_9	VL CDR1	GSSTGAVTSGNYPN
74.	CD3_9	VL CDR2	GTKFLAP
75.	CD3_9	VL CDR3	VLWYSNRWV
76.	CD3_9	VH CDR1	SYAMN
77.	CD3_9	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
78.	CD3_9	VH CDR3	HGNFGNSYVSWWAY
			EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEW
79.	CD3_9	VH	VARIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
			VYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTTLTVSS
			QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPR
80.	CD3_9	VL	GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY
			SNRWVFGGGTKLTVL
			EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEW
			VARIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
			VYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ
81.	CD3_9	scFv	TVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRG
			LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS
			NRWVFGGGTKLTVL
82.	CD3_10	VL CDR1	GSSTGAVTSGNYPN
83.	CD3_10	VL CDR2	GTKFLAP
84.	CD3_10	VL CDR3	VLWYSNRWV
85.	CD3_10	VH CDR1	KYAMN
86.	CD3_10	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
87.	CD3_10	VH CDR3	HGNFGNSYISYWAY
88.	CD3_10	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW

			VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSS QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAITLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVL EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAITLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVL
89.	CD3_10	VL	
90.	CD3_10	scFv	
91.	CD33_1	VH CDR1	NYGMN
92.	CD33_1	VH CDR2	WINTYTGEPTYADKFQG
93.	CD33_1	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
94.	CD33_1	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNSLA
95.	CD33_1	VL CDR2	WASTRES
96.	CD33_1	VL CDR3	QOSAHPFIT
97.	CD33_1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPG QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYC QOSAHPFITFGQGTREIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQOSA HPFITFGQGTREIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQOSA HPFITFGQGTREIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA ITLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
98.	CD33_1	VL	
99.	CD33_1	scFv	
100.	CD33_1	биспеци фическа я молекул а	
101.	CD33_2	VH CDR1	NYGMN
102.	CD33_2	VH CDR2	WINTYTGEPTYADKFQG

103.	CD33_2	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
104.	CD33_2	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNSLA
105.	CD33_2	VL CDR2	WASTRES
106.	CD33_2	VL CDR3	QQSAHFPIIT QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQCLEW
107.	CD33_2	VH	MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPG
108.	CD33_2	VL	QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYC QQSAHFPIITFGCGTRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM
109.	CD33_2	scFv	TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQSA HFPIITFGCGTRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM
110.	CD33_2	биспеци фическа я молекул а	TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQSA HFPIITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNLAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSTLVSPGGTIVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
111.	CD33_3	VH CDR1	NYGMN
112.	CD33_3	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
113.	CD33_3	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
114.	CD33_3	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNSLA
115.	CD33_3	VL CDR2	WASTRES
116.	CD33_3	VL CDR3	QQSAHFPIIT QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
117.	CD33_3	VH	MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMSSDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTTVTVSS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPG
118.	CD33_3	VL	QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYC QQSAHFPIITFGQGTTRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
119.	CD33_3	scFv	MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMSSDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM

			TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSA HFPITFGQGRLEIK
120.	CD33_4	VH CDR1	NYGMN
121.	CD33_4	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
122.	CD33_4	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLKW
123.	CD33_4	VL CDR1	MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTSDTSTSTAYLELHNLRSDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSS
124.	CD33_4	VL CDR2	KSSQSVLDSSKNKNSLA
125.	CD33_4	VL CDR3	WASTRES
126.	CD33_4	VH	QQSAHFPIT DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPG
127.	CD33_4	VL	QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYC QQSAHFPITFGQGRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLKW MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTSDTSTSTAYLELHNLRSDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSDIVM
128.	CD33_4	scFv	TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSA HFPITFGQGRLEIK
129.	CD33_5	VH CDR1	NYGMN
130.	CD33_5	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
131.	CD33_5	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
132.	CD33_5	VL CDR1	KSSQSVLDSSKNKNSLA
133.	CD33_5	VL CDR2	WASTRES
134.	CD33_5	VL CDR3	QQSAHFPIT QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLKW
135.	CD33_5	VH	MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPG
136.	CD33_5	VL	QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYC QQSAHFPITFGQGRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQGLKW MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSDIVM
137.	CD33_5	scFv	TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSA HFPITFGQGRLEIK
138.	CD33_6	VH CDR1	NYGMN
139.	CD33_6	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
140.	CD33_6	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY

141.	CD33_6	VL CDR1	KSSQSVLDSSKNKNSLA
142.	CD33_6	VL CDR2	WASTRES
143.	CD33_6	VL CDR3	QQSAHFPIT QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKW
144.	CD33_6	VH	MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTSDTSTSTAYMEISSLRSDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPG
145.	CD33_6	VL	QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYC QQSAHFPITFGQGTTRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKW MGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTSDTSTSTAYMEISSLRSDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM
146.	CD33_6	scFv	TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSA HFPITFGQGTTRLEIK
147.	CD33_7	VH CDR1	NYGMN
148.	CD33_7	VH CDR2	WINTYTGETNYADKFQG
149.	CD33_7	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
150.	CD33_7	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNSLA
151.	CD33_7	VL CDR2	WASTRE
152.	CD33_7	VL CDR3	QQSAHFPIT QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLEW
153.	CD33_7	VH	MGWINTYTGETNYADKFQGRVTFTSDTSTSTAYMELRNKSDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSS DIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPG
154.	CD33_7	VL	QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYC QQSAHFPITFGQGTTRLDIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLEW MGWINTYTGETNYADKFQGRVTFTSDTSTSTAYMELRNKSDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM
155.	CD33_7	scFv	TQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSA HFPITFGQGTTRLDIK
156.	CD33_8	VH CDR1	NYGMN
157.	CD33_8	VH CDR2	WINTYTGETNYADKFQG
158.	CD33_8	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
159.	CD33_8	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNSLA
160.	CD33_8	VL CDR2	WASTRES
161.	CD33_8	VL CDR3	QQSAHFPIT QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLEW
162.	CD33_8	VH	MGWINTYTGETNYADKFQGRVTFTSDTSTSTAYMELRNKSDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSS

163.	CD33_8	VL	DIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPG QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYC QQSAHFPIITFGQGTRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGGGLEW MGWINTYTGETNYADKFQGRVTFTSDTSTSTAYMELRNLSDDTAVY
164.	CD33_8	scFv	YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIVM TQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSA HFPIITFGQGTRLEIK
165.	CD33_9	VH CDR1	NYGMN
166.	CD33_9	VH CDR2	WINTYTGEPTYADKFQG
167.	CD33_9	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
168.	CD33_9	VL CDR1	KSSQSVLDSNNKNLSLA
169.	CD33_9	VL CDR2	WASTRES
170.	CD33_9	VL CDR3	QQSAHFPIIT QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGGGLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVY
171.	CD33_9	VH	YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSNNKNSLAWYQQKPG QPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDGLQPEDSATYYC QQSAHFPIITFGQGTRLEIK QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGGGLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVY
172.	CD33_9	VL	YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSNNKNSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDGLQPEDSATYYCQQSA HFPIITFGQGTRLEIK DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWYQQIPGQP PKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQ STEDPWTFGGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELVRPG
173.	CD33_9	scFv	SSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIWPGDGDTNYNG KFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYY AMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGY TFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGGGGGGGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSY MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISME AEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKHNNNNNN QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY
174.	CD19	биспеци фическа я молекул а	YCARWSWSDGYVYFDYWGGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK
175.	CD33_2	биспеци фическа я молекул	

176.	MS_4	биспечи фическа я молекул a+hALB	LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQSA HFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNKLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLPGGGSDAHKSE VAHRFKDLGEEFNKALVLIQYQCPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESA ENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPRLPRLVLRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYA PELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLEKSHCIAE VENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR HPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL LGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC CTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKADDKETCFAE EGKKLVAASQAALGLDYHHHHH QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMTWIRQAPGKLEW LSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNSLRAEDTAV YCARDRNSHFDYWGGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPS SVSASVGRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPKAPKLLIYGASGLQS GVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQAKSFRTFGQGTK VEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNKLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLPGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEE FNKALVLIQYQCPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPRLPRL VLRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAK TYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQL GEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSAL EVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVK
------	------	--	---

177.	FAPa	биспеци фическа я молекул а	HKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAAASQA ALGLDYHHHHHH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAHGQSLEW MGGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTASTAYMELRSLRSEDYAVY YCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQGTILTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDI VMTQTFFSLPVTPEEPASISCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQS PKLLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYQCQQ YFSYPLTFGGGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQG TLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
			GGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNISYAMNWVRQAPGKLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSNTAYLQMNLLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTILTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGQ TVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSGTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRG LIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVL
			QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFITNYGMNVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQA HFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTIL TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSGTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGKAA LTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
178.	G4S	линкер	GGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNISYAMNWVRQAPGKLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSNTAYLQMNLLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTILTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGQ TVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSGTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRG LIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVL
179.	F12q	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFITNYGMNVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQA HFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTIL TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSGTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGKAA LTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
180.	конструкт антитела CD33-scFc BiTE CD33_2- scFc	биспеци фическа я молекул а HLE	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFITNYGMNVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQA HFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTIL TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSGTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGKAA LTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
			QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFITNYGMNVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQA HFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTIL TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSGTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGKAA LTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
			QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFITNYGMNVKQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPK LLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQA HFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTIL TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSGTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGKGKAA LTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

181.	FL1	scFv		QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMGVSWIRQPPGKCL EWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVVLMTNVDVDTAT YYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGI RNDLGWYQQKPGKAPKRLIY AASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPL TFGCGTKVEIK QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMGVSWIRQPPGKCL EWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVVLMTNVDVDTAT YYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGI RNDLGWYQQKPGKAPKRLIY AASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPL TFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGGQTVVTVQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSV LTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMEALHNHYTQKSLSLSP GK QVTLKESGPALVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMAVSWIRQPPGKCL EWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPEDTAT YYCARIVGYGTGWYGFDDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGI RNDLAWYQQKPGKAPKRLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPL TFGCGTKVEIK QVTLKESGPALVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMAVSWIRQPPGKCL EWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPEDTAT YYCARIVGYGTGWYGFDDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGI RNDLAWYQQKPGKAPKRLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPL TFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVS
182.	Конструкт	биспеци		
	антитела	фическа		
	FLT3-scFc	я		
	BiTE	молекул		
183.	FL1-scFc	а HLE		
184.	Конструкт	биспеци		
	антитела	фическа		
	FLT3-scFc	я		
	BiTE	молекул		
184.	FL2-scFc	а HLE		

185.	BC1	scFv	SGGGSGGGSGGGSGT	VVTQEP	SLTVSPGGT	VTLT	CGSSTGAVTS
			GNYPN	WVQQKPGQAPRGLIGG	TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS		
			GVQPEDEAEY	YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPCPAP			
			ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV			
			DGVEVHNAKTKPCEEQY	GYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK			
			ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY				
			PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG				
			NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG				
			GGGGSGGGSDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVS			
			VLT	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK			
			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHI	IHWVRQAPGQCLEW			
			MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYME	LSLRSED	TAVY		
			YCARDGYRDTDVLDYWGQGT	LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMT			
			QSPSSLSASVGD	RVTTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYS			
			RLHTGVPSR	FGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG			
			CGTKLEIK				
			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHI	IHWVRQAPGQCLEW			
			MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYME	LSLRSED	TAVY		
			YCARDGYRDTDVLDYWGQGT	LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMT			
			QSPSSLSASVGD	RVTTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYS			
			RLHTGVPSR	FGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG			
			CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS	CAASGFTFNKYA			
			MNWVRQAPGKLEW	VARI	RSKYNNYATYYADSVKDRFTISR	DDSKNT	
			AYLQMN	NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGG			
			GGSGGGSGGGSGT	VVTQEP	SLTVSPGGT	VTLT	CGSSTGAVTS
			GNYPN	WVQQKPGQAPRGLIGG	TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS	SGVQ	
			PEDEAEY	YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPCPAPELL			
			GGPSVFLFPPKPKDTLMI	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV			
			EVHNAKTKPCEEQY	GYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP			
			APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD				
			IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF				
			SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG				
			GGGGSGGGSDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLT			
			VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS				
			REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD				
			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				
187.	BC2	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHI	IHWVRQAPGQGLEW			

			MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSEDТАVY
			YCARDGYRDTDVLDYWGQGTЛTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMT
			QSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYS
			RLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG
			QGTKLEIK
			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHNIIHWVRQAPGGGLEW
			MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSEDТАVY
			YCARDGYRDTDVLDYWGQGTЛTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMT
			QSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYS
			RLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG
			QGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA
			MNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT
			AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTЛTVSSGG
	конструкт	биспеци	GGSGGGSGGGGSQTVVTTQEPSTVSPGGTVLTGSGSTGAVTSGNY
	антитела	фическа	PNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ
188.	BCMA-scFc	я	PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPCPAPELL
	BiTE 2	молекул	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
	BC2-scFc	а HLE	EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP
			APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
			IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
			SCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
			GGGGGSKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
			CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT
			VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
			REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSMSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию биспецифического одноцепочечного антитела, связывающуюся с антигеном на поверхности клетки мишени посредством первого связывающего домена и с поверхностным антигеном CD3 T-клеток посредством второго связывающего домена, β-циклодекстрин и буфер, где композиция является стабильной, где β-циклодекстрин представляет собой натриевую соль сульфобутилового эфира β-циклодекстрина.

2. Композиция по п.1, где β-циклодекстрин присутствует в концентрации от 0,1 до 20% (мас./об.), предпочтительно от 0,5 до 2% (мас./об.) и более предпочтительно от 0,8 до 1,5% (мас./об.).

3. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где конструкция биспецифического одноцепочечного антитела присутствует в диапазоне концентраций 0,1-5 мг/мл, предпочтительно 0,2-2,5 мг/мл, более предпочтительно 0,25-1,0 мг/мл.

4. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где буфер выбран из группы, состоящей из фосфата калия, уксусной кислоты/ацетата натрия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты/сукцината натрия, винной кислоты/тарtrate натрия, гистидина/гистидина HCl, глицина, Tris, глутамата, ацетата и их смесей.

5. Композиция по п.4, где буфер выбран из группы, состоящей из фосфата калия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты, гистидина, глутамата, ацетата и их комбинаций.

6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где pH композиции находится в диапазоне от 4 до 7,5.

7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая один или несколько наполнителей, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита, сорбита, аргинина, лизина, полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188, плуроника и их комбинаций.

8. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая содержит один или несколько консервантов.

9. Композиция по п.8, где один или несколько консервантов выбраны из группы, состоящей из бензилового спирта, хлорбутанола, фенола, метакрезоло, метилпарабена, феноксиэтанола, пропилпарабена и тиомерсала.

10. Композиция по любому из пп.1-8, где первый связывающий домен конструкции биспецифического одноцепочечного антитела связывается с CD19, CD33, MSLN, FLT3 или BCMA.

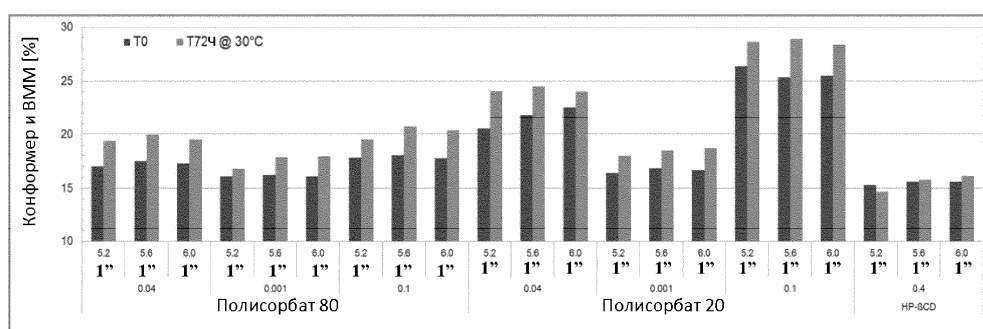
11. Композиция по п.10, где аминокислотная последовательность первого связывающего домена конструкции биспецифического одноцепочечного антитела выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 99, 109, 119, 128, 137, 146, 155, 164, 173, 183, 185 и 187, и аминокислотная последовательность вто-

рого связывающего домена конструкции биспецифического одноцепочечного антитела выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 179 и 90.

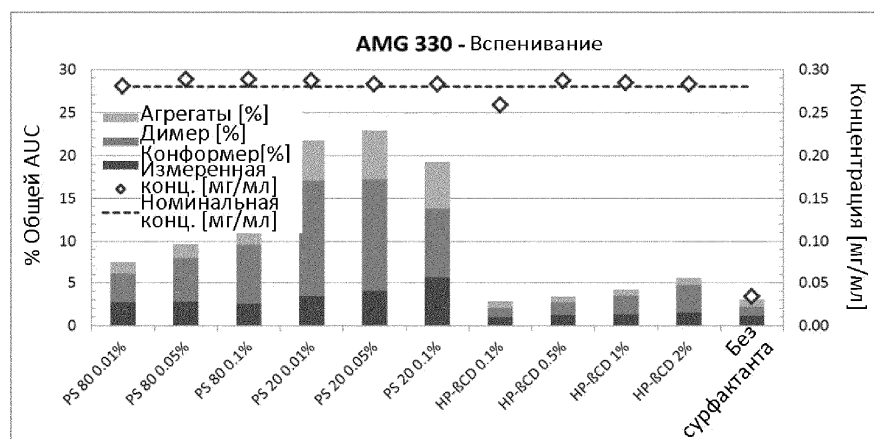
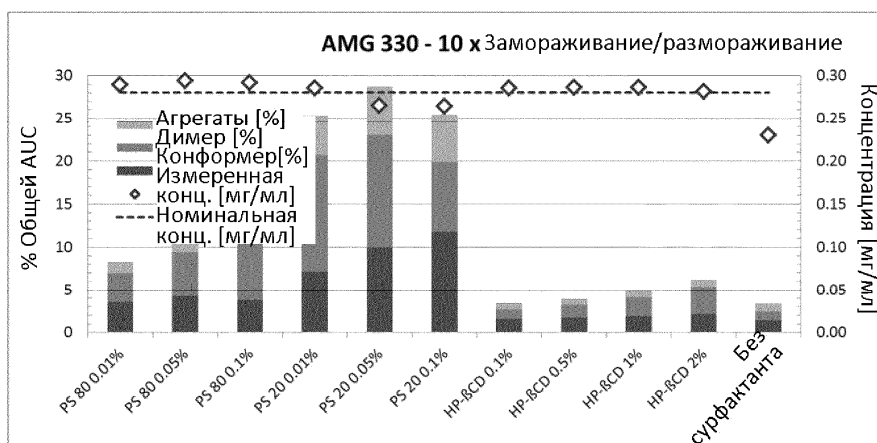
12. Композиция по п.11, состав которой не содержит консервантов, аминокислотная последовательность конструкции биспецифического одноцепочечного антитела представляет собой SEQ ID NO: 100 или 110, и конструкция находится в концентрации около 0,5 мг/мл, циклодекстрин представляет собой натриевую соль сульфобутилового эфира β -циклодекстрина в концентрации около 1% (мас./об.), буфер представляет собой фосфат калия в концентрации около 10 мМ, и состав дополнительно содержит сахарозу в концентрации около 8% (мас./об.) и полисорбат 80 в концентрации около 0,01% (мас./об.) при pH около 6,0.

13. Композиция по п.10, где аминокислотная последовательность первого связывающего домена конструкции биспецифического одноцепочечного антитела представляет собой SEQ ID NO: 174.

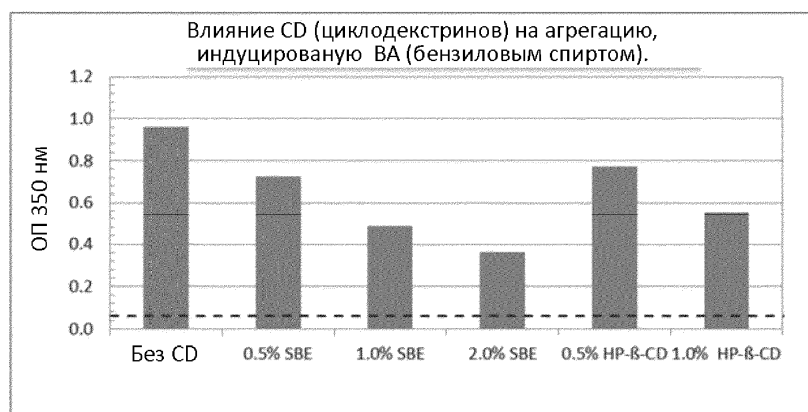
14. Композиция по п.11, где циклодекстрин представляет собой натриевую соль сульфобутилового эфира β -циклодекстрина в концентрации около 1% (мас./об.), буфер представляет собой фосфат калия в концентрации около 10 мМ и состав дополнительно содержит маннит в концентрации около 2%, сахарозу в концентрации около 2% (мас./об.) и полисорбат 80 в концентрации около 0,01% (мас./об.) при pH около 6.



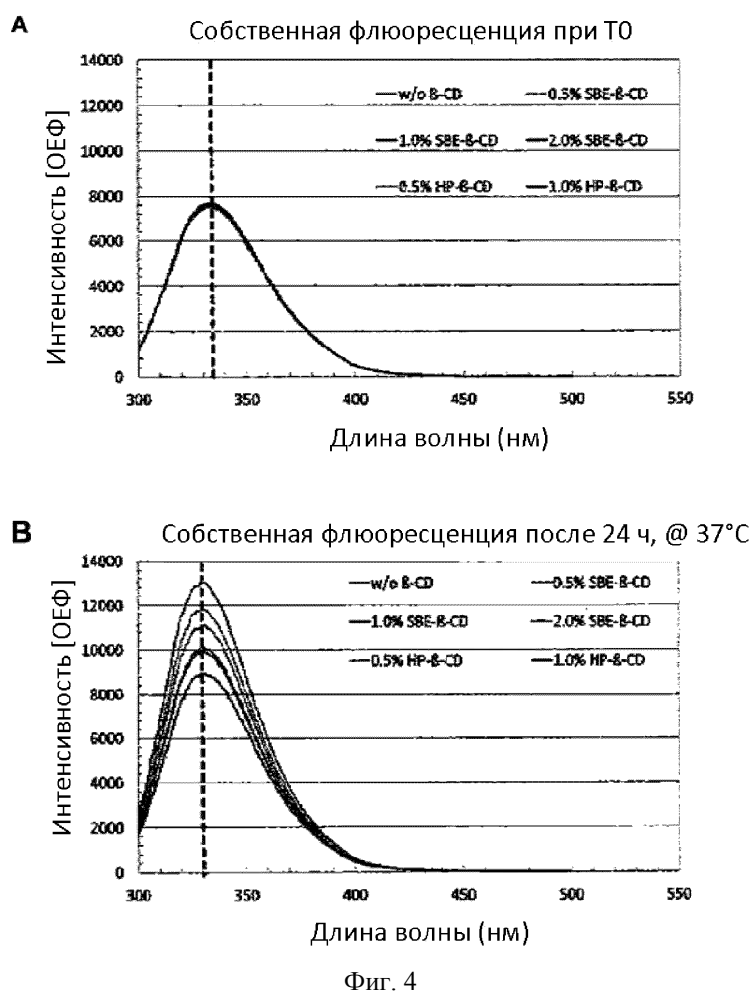
Фиг. 1

A**B****C**

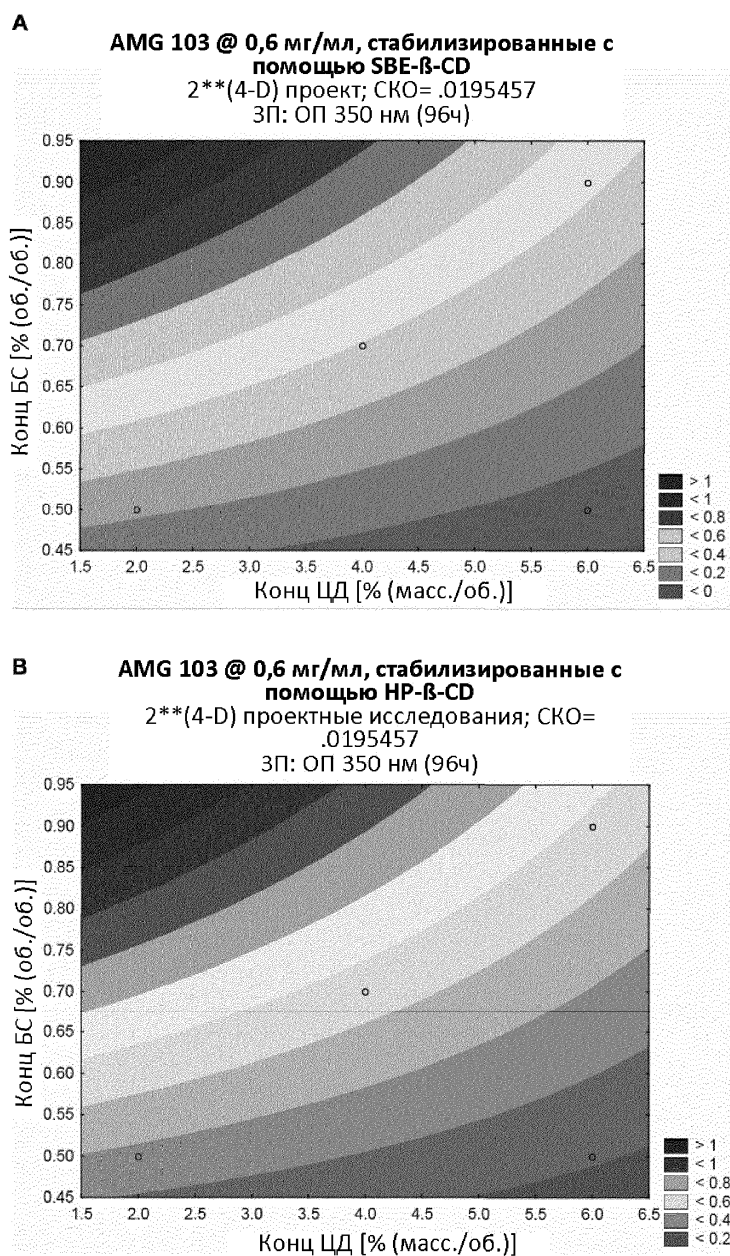
Фиг. 2



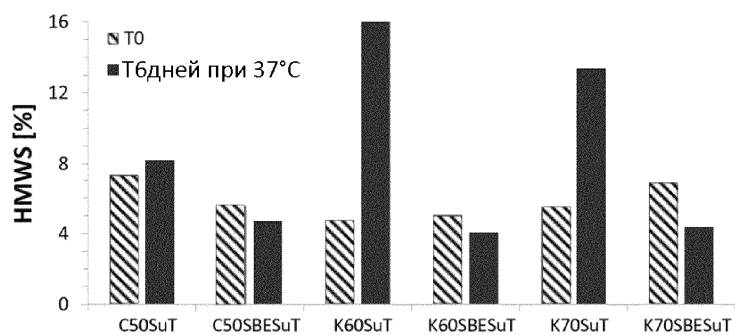
Фиг. 3



Фиг. 4

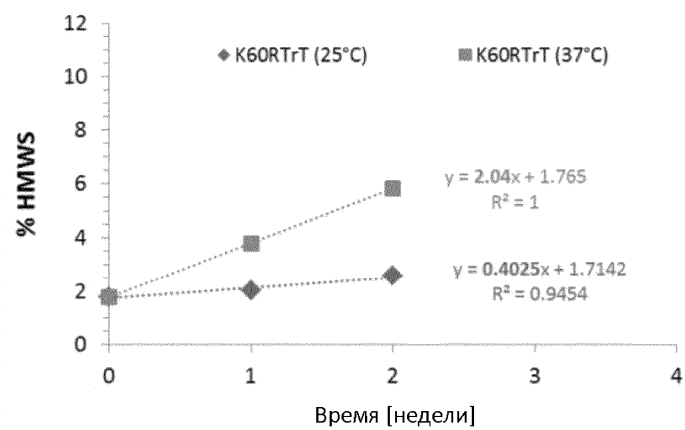


Фиг. 5

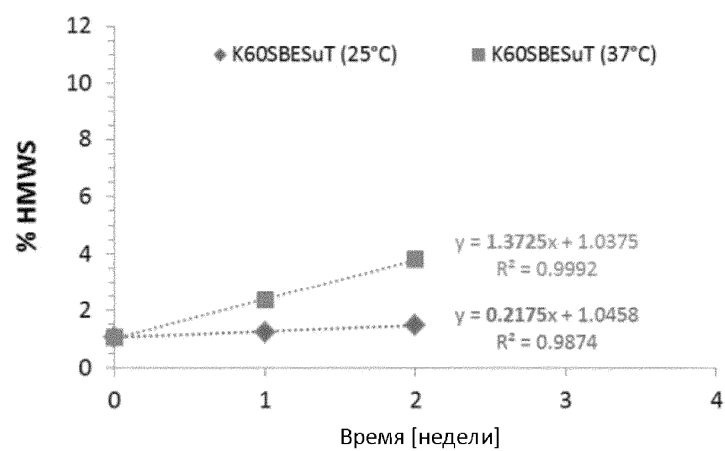


Фиг. 6

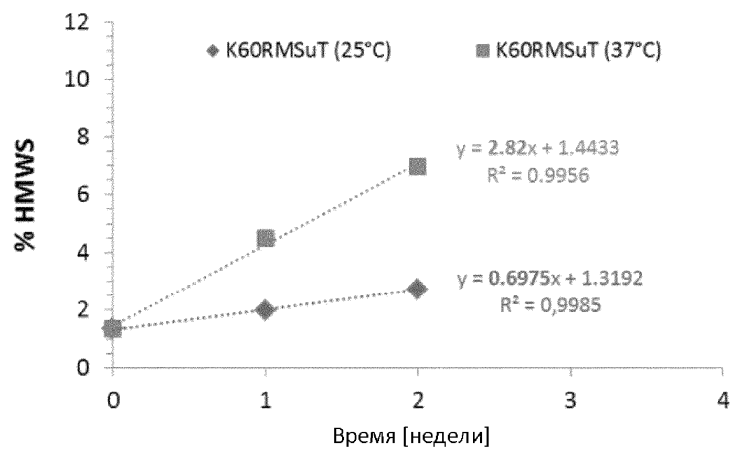
A



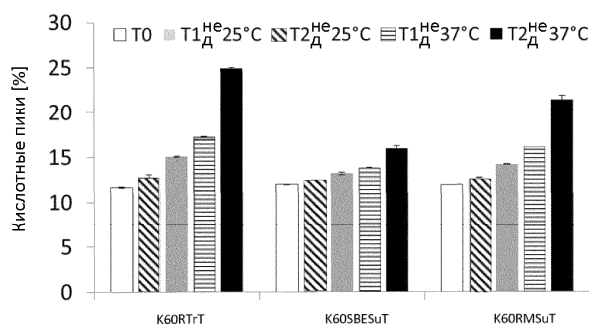
B



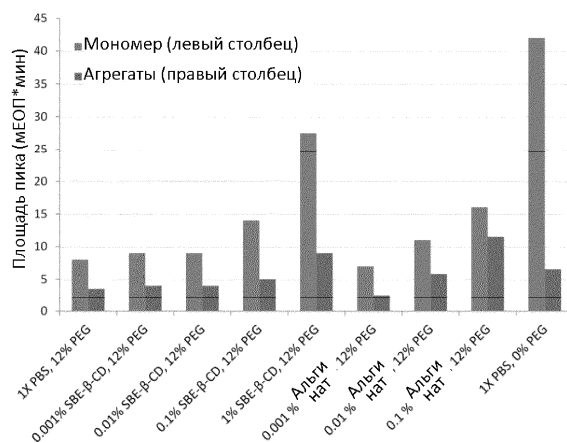
C



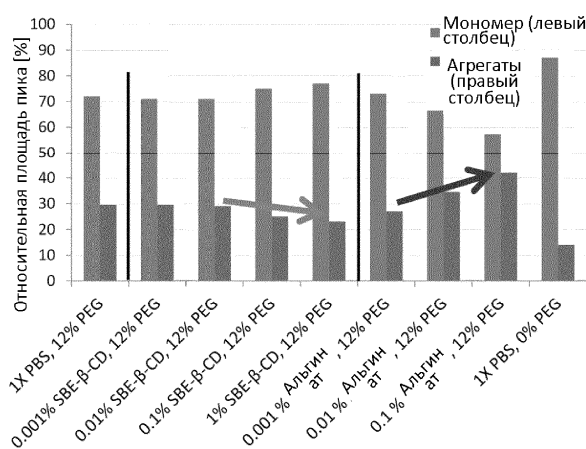
Фиг. 7



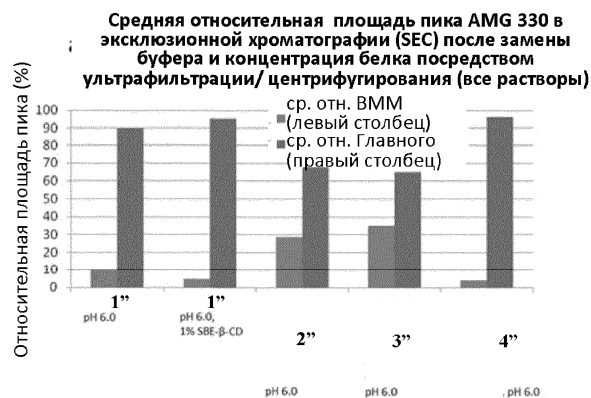
Фиг. 8



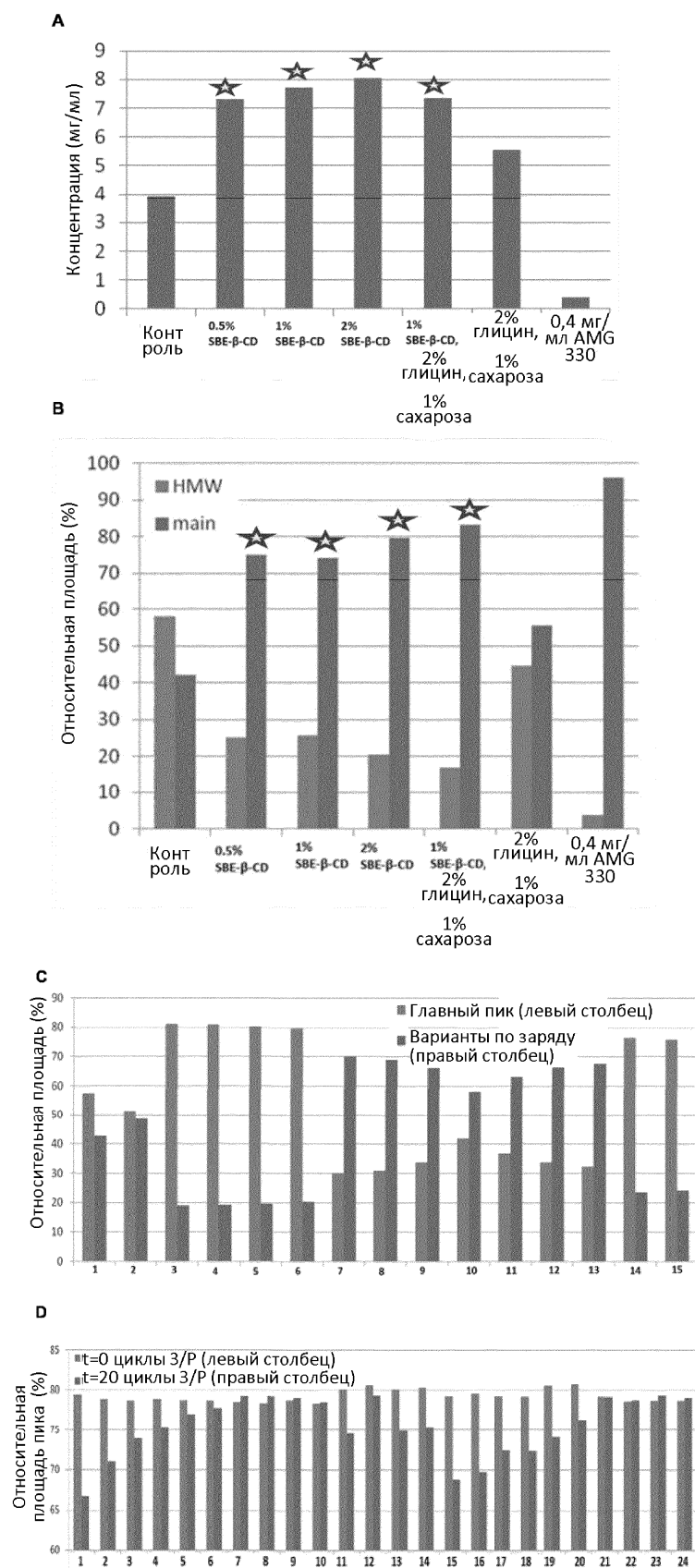
Фиг. 9



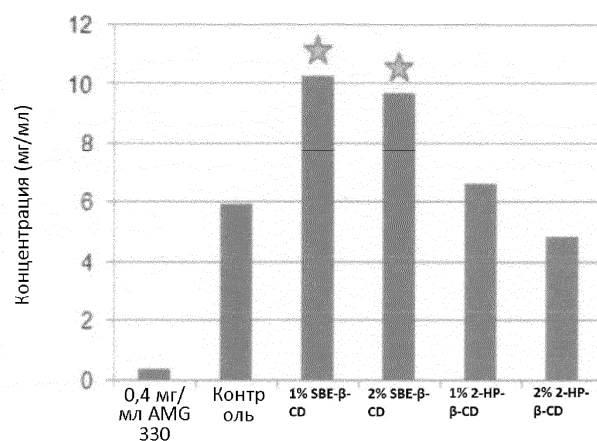
Фиг. 10



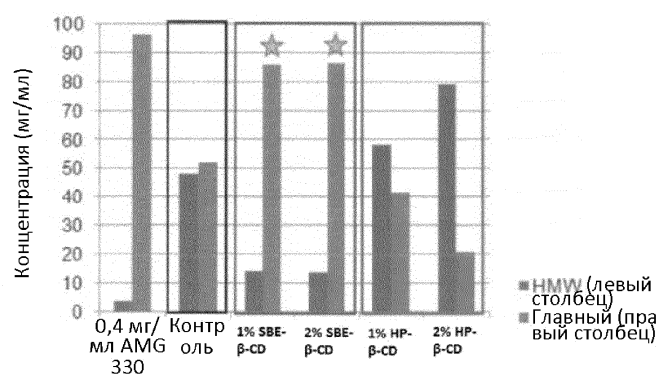
Фиг. 11



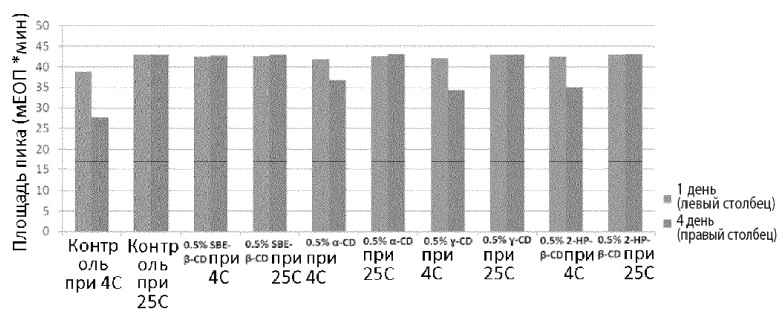
Фиг. 12



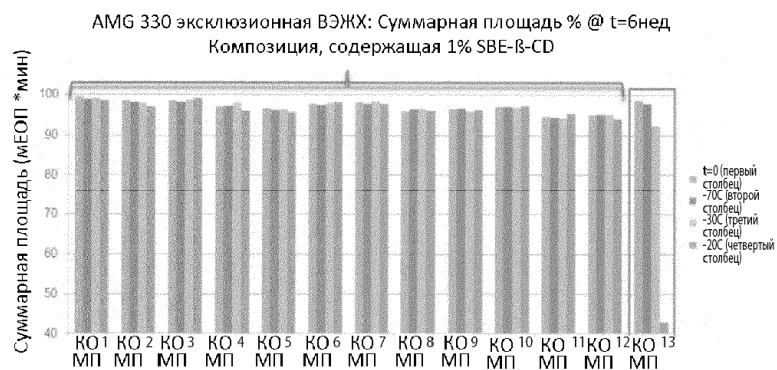
Фиг. 13



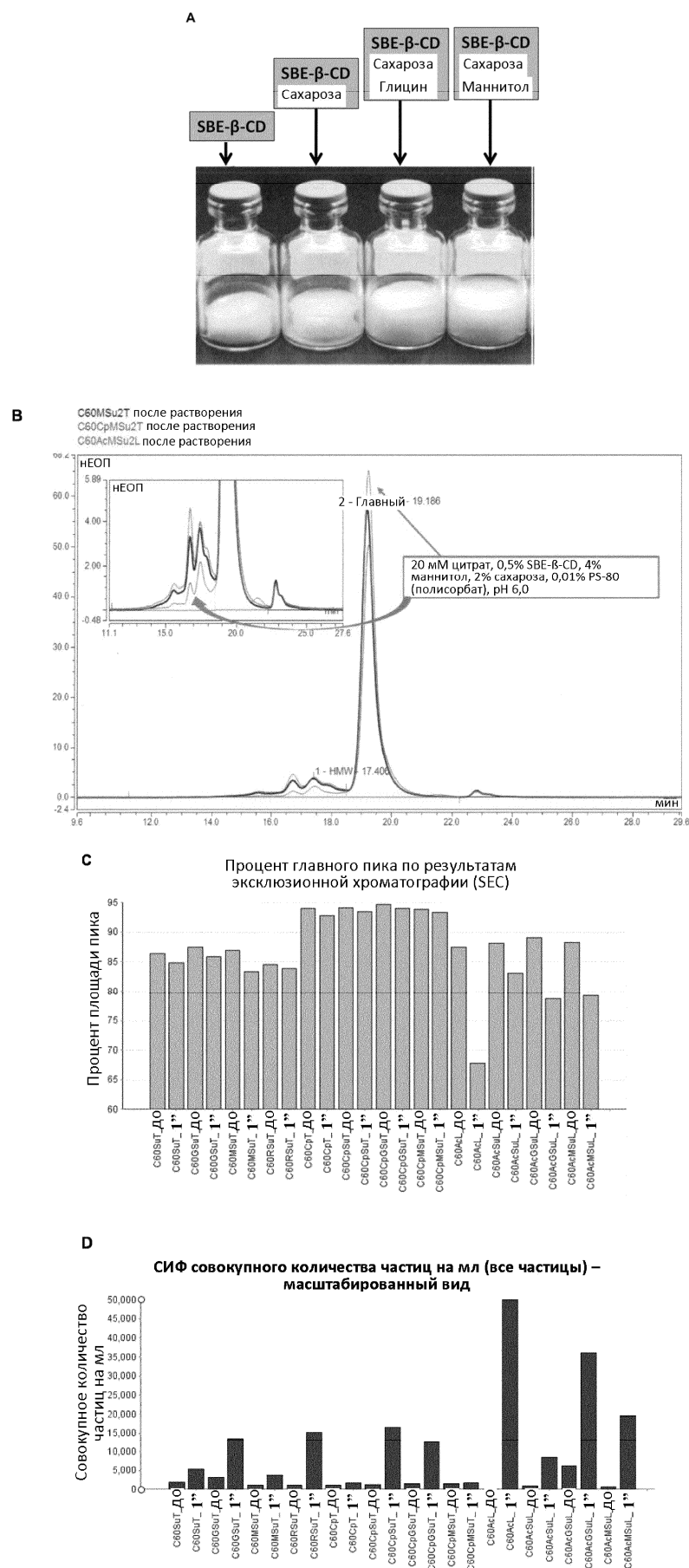
Фиг. 14



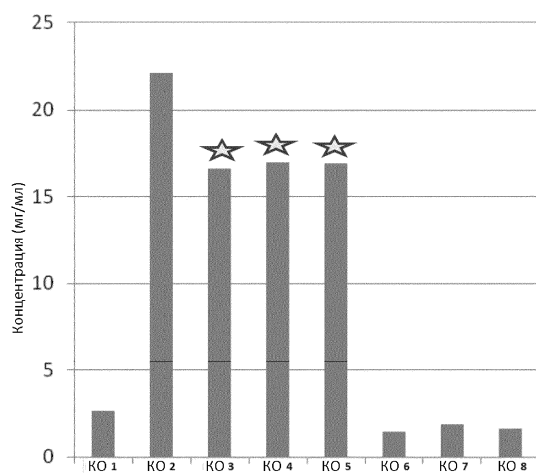
Фиг. 15



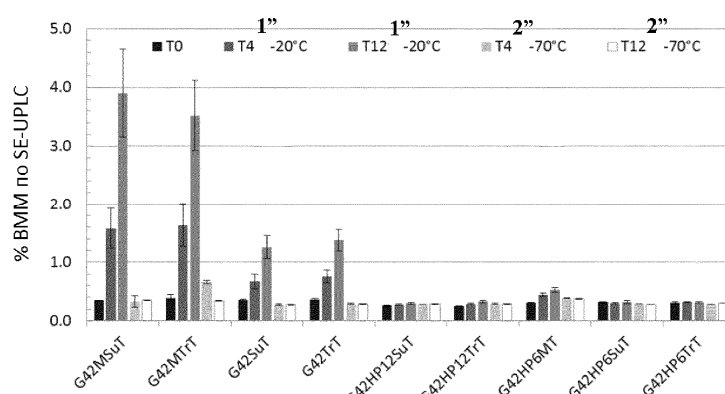
Фиг. 16



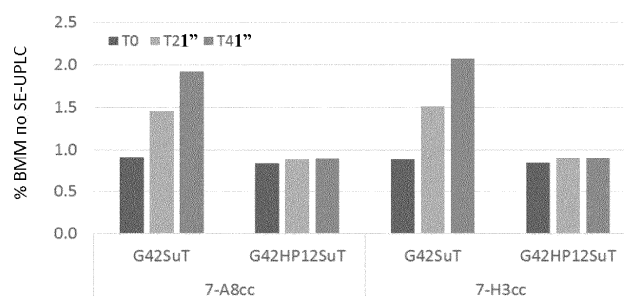
Фиг. 17



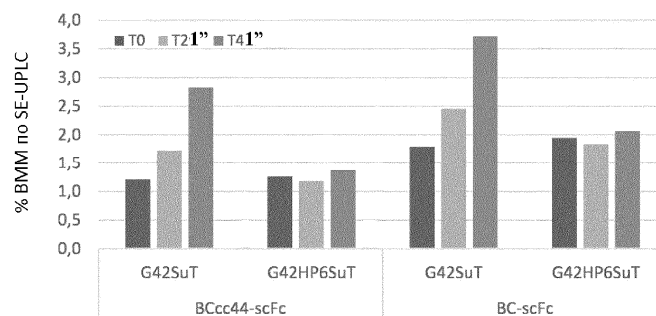
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

