

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390669** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.04.21

(22) Дата подачи заявки
2021.08.23

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ БИСПЕЦИФИЧНОЕ
АНТИТЕЛО ВiТЕ И МЕТИОНИН**

(31) 63/069,432; 63/197,020

(32) 2020.08.24; 2021.06.04

(33) US

(86) PCT/US2021/047181

(87) WO 2022/046651 2022.03.03

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Джаганнатан Бхарадвадж (US)

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

(57) В изобретении предложен препарат, содержащий, например, конструкцию биспецифического антитела, буфер, сахарид, поверхностно-активное вещество и метионин.

A1

202390669

202390669

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576636EA/019

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО ВіТЕ И МЕТИОНИН

Область техники изобретения

[0001] Настоящее изобретение относится к препаратам, обеспечивающим стабильность конструкций биспецифичных антител.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ И ВКЛЮЧЕНИЕ В ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ ПУТЕМ ССЫЛКИ материала, представленного в электронном виде

[0002] Настоящая заявка испрашивает приоритет основании предварительных заявок на патент США №№ 63/069432 и 63/197020, поданных 24 августа 2020 г. и 4 июня 2021 г., соответственно, которые полностью включены в настоящий документ ссылкой.

[0003] Одновременно с данной заявкой подается машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный путем ссылки во всей своей полноте, который обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) под названием «55632A_Seqlisting.txt», 362 796 байт, созданный 11 августа 2021 г.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

[0005] В настоящее время фармацевтические препараты на основе белков, таких как рекомбинантные белки, можно получать с высокой степенью чистоты при их первичном изготовлении, благодаря достижениям в способах очистки в промышленном масштабе. Однако белки обладают низкой стабильностью и в высокой степени подвержены деградации, как химической, так и физической. Химическая деградация относится к модификациям, которые затрагивают ковалентные связи. К таким модификациям относятся дезамидирование, окисление, расщепление или образование новых дисульфидных связей, гидролиз, изомеризация или дегликозилирование. Физическая деградация включает разворачивание белка, нежелательную адсорбцию на поверхностях и агрегацию. Решение проблем, обусловленных такой физической и химической нестабильностью, является одной из наиболее сложных задач при разработке фармацевтических препаратов на основе белков (Chi и др., Pharm Res, Vol. 20, №. 9, Sept

2003, стр. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80).

[0006] В данной области техники существует потребность в фармацевтических препаратах, в которых улучшена стабильность терапевтических белков для транспортировки и хранения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Для фармацевтических препаратов на основе белков, включая конструкции биспецифичных и мультиспецифичных антител, которые одновременно связываются с двумя (или более) различными антигенами, такие как конструкции антител, взаимодействующих с биспецифичными Т-клетками (ViTE®), характерна низкая стабильность белков. Это распространяется и на те конструкции на основе антител, которые содержат структуры, увеличивающие период полувыведения (структуры HLE), которые включают одноцепочечную структуру Fc (обозначаемую scFc), гетеро Fc (также обозначаемую как hetFc или гетеродимерный Fc, hFc) и гибриды сывороточного альбумина человека (также обозначаемый как HSA или hALB). Конструкции биспецифичных антител, включая конструкции ViTE HLE, подвержены агрегации (т. е. образованию частиц с высокой молекулярной массой (HMW)) при замораживании и хранении, например, при -30°C . При такой нестабильности, чтобы свести к минимуму агрегацию, требуется хранение при температуре -70°C . Однако требование поддерживать температуру на уровне -70°C создает серьезные проблемы при хранении и транспортировке, поскольку для постоянного поддержания низкой температуры необходимо специальное оборудование и регламент.

[0008] Настоящее раскрытие основано, по крайней мере частично, на неожиданном открытии того, что метионин снижает образование частиц HMW биспецифичных конструкций антител при замораживании и хранении при -30°C . Как показано в примере, описанном в данном документе, метионин снижал агрегацию (т.е. появление частиц HMW) примерно на 25-85% в замороженных препаратах, содержащих конструкции биспецифичных антител, хранящихся при -30°C ; аналогичный защитный эффект не был обнаружен в жидких препаратах, хранившихся при 4°C или 40°C в течение такого же периода времени. Материалы и способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают значительное техническое преимущество, например, за счет упрощения оборудования и регламента, необходимых для хранения и транспортировки конструкций биспецифичных антител, при этом минимизируя агрегацию.

[0009] В различных аспектах настоящего изобретения предложен фармацевтический препарат, содержащий конструкцию биспецифичного антитела, сахарид, поверхностно-активное вещество (ПАВ), буфер и метионин, при молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X (например, при молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 50X до примерно 5000X). Необязательно, препарат может содержать от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ метионина. pH препарата составляет от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6,

например, примерно 4,2). Необязательно сахарид представляет собой сахарозу, ПАВ представляет собой полисорбат 80, и/или буфер представляет собой глутаматный буфер. В различных аспектах концентрация конструкции биспецифичного антитела в препарате составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. В различных вариантах осуществления препарат замораживают. Например, в данном раскрытии предложен замороженный фармацевтический препарат, содержащий от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл конструкции биспецифичного антитела, сахарозу, глутаминовую кислоту, полисорбат 80 и от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ метионина, где рН препарата составляет от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6). В альтернативных вариантах осуществления препарат представляет собой размороженный препарат или лиофилизированный препарат. В различных аспектах конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188.

[0010] В данном раскрытии дополнительно предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту препарата данного изобретения. В частности рассмотрено применение препарата в любом из способов, раскрываемых в данном документе, или для получения лекарственных средств для введения в соответствии с любым из способов, раскрываемых в данном документе. В данном раскрытии также предложен препарат, описываемый в данном документе, для применения в лечении рака.

[0011] Кроме того, в данном раскрытии предложен способ, включающий (а) приготовление препарата, содержащего конструкцию биспецифичного антитела, метионин и буфер, где метионин присутствует в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X; (b) замораживание препарата, полученного на стадии (а); и (с) хранение препарата, полученного на стадии (b), при температуре от примерно -10°C до примерно -40°C. В различных аспектах изобретения стадии (b) и (с) осуществляют при температуре от примерно -20°C до примерно -35°C (например, -30°C) и/или стадия (с) включает хранение препарата в течение минимум одного месяца. Необязательно, способ дополнительно включает (d) размораживание препарата со стадии (с); и (е) лиофилизацию препарата, полученного на стадии (d). В некоторых вариантах осуществления препарат содержит метионин при молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 50X до примерно 5000X, например, содержание метионина составляет от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ, и/или концентрация конструкции

биспецифичного антитела составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл.

[0012] Следует понимать, что хотя различные варианты осуществления в данном описании представлены с использованием формулировки «содержащий» или «включающий», при различных обстоятельствах соответствующий вариант осуществления также может быть описан с использованием формулировок «состоящий из» или «в основном состоящий из». В данном раскрытии также подразумеваются варианты осуществления, описываемые как «содержащие» признак, включая варианты осуществления, которые «состоят из» или «в основном состоят из» признака. Термины, используемые в форме единственного числа, также относятся к форме множественного числа. Например, подразумевается, что «конструкция биспецифичного антитела» представляет собой одну или несколько конструкций биспецифичного антитела. Как таковые, формы единственного числа, выражения «один или несколько», «не менее одного» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Термин «или» следует понимать как охватывающий элементы попеременно или вместе, если контекст однозначно не требует иного.

[0013] Также следует понимать, что при описании пределов значений в данном раскрытии подразумеваются отдельные значения, находящиеся в данных пределах. Например, «рН от примерно рН 4 до примерно рН 6» может составлять, но не ограничиваться этим, рН 4.2, 4.6, 5.2, 5.5 и т. п. и любое значение между такими значениями. В любом из пределов, описанных в данном документе, предельные значения включены в рассматриваемый интервал. Однако в данном описании также рассматриваются такие же пределы, из которых исключено наименьшее и/или наибольшее предельные значения. При использовании термин «примерно» подразумевается указанное число плюс или минус 5%, 10% или более от указанного числа. Фактическое предполагаемое отклонение определяется по контексту.

[0014] Дополнительные признаки и варианты данного изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из всего объема данной заявки, включающей фигуры и подробное описание, и все такие признаки рассматриваются как аспекты данного изобретения. Подобным образом признаки данного изобретения, описанные в данном документе, можно повторно объединять в дополнительные варианты осуществления, которые также рассматриваются как аспекты данного изобретения, независимо от того, являются они комбинацией признаков, конкретно указанных как аспект или вариант осуществления настоящего изобретения, или нет. Предполагается, что весь документ представляет собой единое раскрытие, и следует понимать, что предусмотрены все комбинации описанных в данном документе (даже описанных в разных разделах) признаков, даже в том случае, если комбинация признаков не встречается вместе в одном и том же предложении, абзаце или разделе данного документа. Кроме того, только такие ограничения, которые описаны в данном документе как критичные для настоящего изобретения, следует рассматривать как таковые; варианты настоящего изобретения, лишённые ограничений, которые не были описаны в данном

документе как критичные, рассматриваются как аспекты настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0015] Фигура 1 представляет собой график, показывающий увеличение процентного содержания (%) высокомолекулярных (НМВ) частиц ViTE®-1, ViTE®-2, ViTE®-3, ViTE®-4, ViTE®-5, ViTE®-6, ViTE®-7 и ViTE®-8 в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2) в присутствии (серая полоса слева) и в отсутствие (черная полоса справа) 50 мМ метионина через месяц хранения при -15°C. Хранение при -15°C представляет собой условия ускоренного испытания хранения при -30°C. НМВ частицы детектировали с помощью SE-УВЭЖХ.

[0016] Фигура 2 представляет собой график, показывающий увеличение процентного содержания (%) высокомолекулярных (НМВ) частиц ViTE®-1, ViTE®-2, ViTE®-3, ViTE®-4, ViTE®-5, ViTE®-6, ViTE®-7 и ViTE®-8 в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2) в присутствии и в отсутствие 50 мМ метионина через месяц хранения при 4°C. НМВ частицы детектировали с помощью SE-УВЭЖХ. Измерения, приведенные на графике для каждой конструкции биспецифичного антитела, включают (слева направо): %НМВ, обнаруженный в момент времени 0 в препарате без метионина, %НМВ, обнаруженный через четыре недели в препарате без метионина, %НМВ, обнаруженный в момент времени 0 в препарате с метионином, и %НМВ, обнаруженный через четыре недели в препарате с метионином.

[0017] Фигура 3 представляет собой график, показывающий увеличение процентного содержания (%) высокомолекулярных (НМВ) частиц ViTE®-1, ViTE®-2, ViTE®-3, ViTE®-4, ViTE®-5, ViTE®-6, ViTE®-7 и ViTE®-8 в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2) в присутствии и в отсутствие 50 мМ метионина через месяц хранения при 40°C. НМВ частицы детектировали с помощью SE-УВЭЖХ. Измерения, приведенные на графике для каждой конструкции биспецифичного антитела, включают (слева направо): %НМВ, обнаруженный в момент времени 0 в препарате без метионина, %НМВ, обнаруженный через четыре недели в препарате без метионина, %НМВ, обнаруженный в момент времени 0 в препарате с метионином, и %НМВ, обнаруженный через четыре недели в препарате с метионином.

[0018] Фигура 4 представляет собой график, показывающий увеличение процентного содержания (%) высокомолекулярных (НМВ) частиц ViTE®-1, ViTE®-2, ViTE®-3, ViTE®-4, ViTE®-5, ViTE®-6, ViTE®-7 и ViTE®-8 в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2) в присутствии и в отсутствие 50 мМ метионина через месяц хранения при 4°C лиофилизированной формы препарата. НМВ частицы детектировали с помощью SE-УВЭЖХ. Измерения, приведенные на графике для каждой конструкции биспецифичного антитела, включают (слева направо): %НМВ, обнаруженный в момент времени 0 в препарате без метионина, %НМВ, обнаруженный через четыре недели в препарате без метионина, %НМВ,

обнаруженный в момент времени 0 в препарате с метионином, и %НМW, обнаруженный через четыре недели в препарате с метионином.

[0019] Фигура 5 представляет собой график, показывающий увеличение процентного содержания (%) высокомолекулярных (НМW) частиц ViTE®-1, ViTE®-2, ViTE®-3, ViTE®-4, ViTE®-5, ViTE®-6, ViTE®-7 и ViTE®-8 в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2) в присутствии и в отсутствие 50 мМ метионина через месяц хранения при 40°C лиофилизированной формы препарата. НМW частицы детектировали с помощью SE-УВЭЖХ. Измерения, приведенные на графике для каждой конструкции биспецифичного антитела, включают (слева направо): %НМW, обнаруженный в момент времени 0 в препарате без метионина, %НМW, обнаруженный через четыре недели в препарате без метионина, %НМW, обнаруженный в момент времени 0 в препарате с метионином, и %НМW, обнаруженный через четыре недели в препарате с метионином.

[0020] Фигура 6А представляет собой график, показывающий увеличение уровней агрегации различных конструкций антител (ViTE®) через месяц хранения в замороженном состоянии при -20°C в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2), со вспомогательными аминокислотами и без них (при концентрации 10 мМ). Столбцы для каждого ViTE® представляют, слева направо: без вспомогательной аминокислоты (контроль), аргинин, гистидин, лизин и пролин.

[0021] Фигура 6В представляет собой график, показывающий увеличение уровней агрегации ViTE®-5 через месяц хранения в замороженном состоянии при -20°C в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2), с различными другими формообразующими (при концентрации 50 мМ) и без них (контроль).

[0022] Фигура 6С представляет собой график, показывающий увеличение уровней агрегации ViTE®-5 через месяц хранения в замороженном состоянии при -20°C в препарате, содержащем 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 (PS80) (рН 4,2), с триптофаном в концентрации 50 мМ и без его.

[0023] Фигура 7 представляет собой график, показывающий уровни агрегации ViTE®-5 через месяц хранения в замороженном состоянии при -15°C при различных соотношениях метионина: ViTE®-5. Хранение при -15°C представляет собой условия ускоренного испытания хранения при -30°C. % НМW, измеренный с помощью SE-УВЭЖХ (ось Y), представлен для образцов в момент времени 0 (темные столбцы слева) и через четыре недели хранения в замороженном состоянии (серые столбцы справа). Соотношения отмечены на оси X.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0024] Несмотря на многолетние исследования и разработки, посвященные терапевтическим продуктам на основе антител, их нестабильность остается серьезной проблемой для отрасли. Хранение и транспортировка терапевтических препаратов

антител сопряжены со значительными трудностями, поскольку условия должны поддерживать структуру белка более высокого порядка и при этом сводить к минимуму деградацию и агрегацию, которые негативно влияют на терапевтическую эффективность и повышают потенциальную иммуногенность для пациента. Конструкции биспецифичных антител, описанные в данном документе, например, демонстрируют пониженную стабильность в замороженной форме, что требует использования дорогостоящего оборудования и неудобных процессов для поддержания температуры -70°C при хранении препарата. Неожиданно оказалось, что препараты конструкций биспецифичных антител, содержащие метионин, демонстрируют пониженную агрегацию в ходе хранения при температуре от примерно -10°C до примерно -40°C (например, от примерно -20°C до примерно -35°C , например -30°C), тем самым избегая необходимости в оборудовании и регламентах, требующихся для хранения терапевтического средства при гораздо более низких температурах (например, -70°C).

[0025] В данном раскрытии предложен фармацевтический препарат, содержащий конструкцию биспецифичного антитела, сахарид, ПАВ, буфер и метионин. Метионин необязательно присутствует в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X. pH препарата составляет от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6). В различных аспектах препарат замораживают. В альтернативных случаях препарат представляет собой размороженный препарат или лиофилизированный препарат. Различные аспекты препаратов описаны ниже. Заголовки разделов используются только для удобства чтения; следует понимать, что рассматриваются все комбинации описанных здесь признаков.

Конструкции антител

[0026] «Конструкция антитела» представляет собой белок, содержащий домен, который связывает определенный антиген-мишень (такой как CD3 и/или CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN18.2 или MUC17). В иллюстративных аспектах конструкция антитела представляет собой антитело или иммуноглобулин, их антигенсвязывающий фрагмент или белковый продукт антитела, содержащие антигенсвязывающие домены в остове, каркасе или структуре, которые позволяют антигенсвязывающему домену принимать конформацию, которая способствует связыванию с антигеном.

[0027] Термин "антитело" относится к интактному антигенсвязывающему иммуноглобулину. Антитело может представлять собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, в том числе любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В различных вариантах осуществления интактное антитело содержит две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи. Антитело имеет переменную область и константную область. В форматах IgG переменная область обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), несет основную ответственность за распознавание антигена и существенно варьируется среди других антител, которые связываются с различными антигенами.

Вариабельная область обычно содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи (Kabat и др., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service NIH, Bethesda, MD; см. также Chothia и Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia и др., 1989, *Nature* 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенные как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 по Kabat и др., 1991; см. также Chothia и Lesk, 1987, выше). Константная область позволяет антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы.

[0028] Архитектуру антител использовали для создания растущего спектра альтернативных структур, который охватывает молекулярные массы пределах по меньшей мере примерно 12-150 кДа и характеризуется валентностью (n) от мономерной ($n=1$), до димерной ($n=2$), до трехмерной ($n=3$), до четырехмерной ($n=4$) и потенциально до более высокого порядка; такие альтернативные структуры в данном документе называются «белковыми продуктами на основе антител». Белковые продукты на основе антител включают те, которые основаны на полной структуре антитела, и те, которые имитируют фрагменты антител, которые сохраняют полную антигенсвязывающую способность, например, scFv, стабилизированный дисульфидной связью scFv (ds-scFv), одноцепочечное антитело (SCA), одноцепочечный Fab (scFab) и миниантитела (miniAbs).

[0029] Конструкция антитела может быть «биспецифичной», т.е. антитело или белковый продукт антитела связывает две разные мишени (например, CD3 и вторую, отличающуюся мишень). «Биспецифичное» антитело или антителоподобный продукт обычно содержит первый связывающий домен и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (например, с антигеном поверхности клетки-мишени), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (например, CD3). Соответственно, конструкция антитела, необязательно, обладает специфичностью в отношении двух разных антигенов или мишеней. Термин «антиген-мишень клеточной поверхности» относится к антигенной структуре, экспрессируемой клеткой, которая находится на клеточной поверхности, то есть, доступна для описанной в данном документе конструкции антитела. Он может представлять собой белок, предпочтительно внеклеточную часть белка, или углеводную структуру, предпочтительно углеводную структуру белка, такого как гликопротеин. В различных аспектах он представляет собой опухолевый антиген. Также рассматриваются конструкции мультиспецифичных антител, такие как конструкции триспецифичных антител (включая три связывающих домена) или конструкции, обладающие более чем тремя (например, четырьмя, пятью или более) специфичностями.

[0030] Конструкции биспецифичных антител включают, но не ограничиваются ими, традиционные биспецифичные иммуноглобулины (например, BsIgG), IgG, содержащие присоединенный антигенсвязывающий домен (например, амино- или карбокси-концы легкой или тяжелой цепи соединены с дополнительными антигенсвязывающими доменами, такими как однодоменные антитела или парные вариабельные домены антител (например, Fv или scFv)), конъюгаты BsAb и искусственно

созданные конструкции, содержащие полноразмерные антитела. См., например, Spiess и др., *Molecular Immunology* 67(2) Part A: 97-106 (2015 г.) и международную патентную публикацию № WO 2015149077, где описаны различные биспецифичные структуры, и которые включены в настоящий документ ссылкой. Примеры конструкций биспецифичных антител также включают, но не ограничиваются ими, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные scFv, структуру привлекающего Т-клетки биспецифичного активатора (BiTE®) (составной белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), соединенных линкером), фрагменты BsAb (например, биспецифичные одноцепочечные антитела), биспецифичные составные белки (например, антигенсвязывающие домены, составленные с эффекторным фрагментом) и биспецифичные Fab₂ (в совокупности также называемые «белковые продукты биспецифичных антител»). См, например, Chames и Baty, 2009, *mAbs* 1[6]:1-9; и Holliger и Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 23[9]:1126-1136; Wu и др., 2007, *Nature Biotechnology* 25[11]:1290-1297; Michaelson и др., 2009, *mAbs* 1[2]:128-141; международные публикации заявок на патент № 2009032782 и 2006020258; Zuo и др., 2000, *Protein Engineering* 13[5]:361-367; публикацию заявки на патент США № 20020103345; Shen и др., 2006, *J Biol Chem* 281[16]:10706-10714; Lu и др., 2005, *J Biol Chem* 280[20]:19665-19672; и Kontermann, 2012 *MAbs* 4(2):182, которые в явной форме включены в данный документ.

[0031] Термин «связывающий домен» относится к домену, который (специфично) связывается (т.е. взаимодействует или распознает) с данным эпитопом-мишенью или данным сайтом-мишенью на молекуле-мишени (антигене), такой как, например, CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN18.2, MUC17 или CD3. В конструкции биспецифичного антитела, например, структура и функция первого связывающего домена (распознающего, например, CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN18.2 или MUC17), и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена (распознающего CD3), основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекуле иммуноглобулина. В альтернативном случае, структуру и функцию заимствуют из доменов переменной области тяжелой цепи (VH) и/или переменной области легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Предпочтительно, чтобы первый связывающий домен характеризовался наличием 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). Второй связывающий домен, предпочтительно, также предусматривает минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают связывание мишени. Более предпочтительно, чтобы второй связывающий домен содержал по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или три CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). В различных аспектах один или несколько антигенсвязывающих доменов являются человеческими, гуманизированными или химерными.

[0032] В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела содержит конструкцию одноцепочечного антитела. scFv содержит переменную область тяжелой цепи, линкер scFv и переменную область легкой цепи. С-конец переменной области легкой цепи, необязательно, присоединен к N-концу линкера scFv, С-конец которого присоединен к N-концу переменной области тяжелой цепи (N-vh-линкер-vl- C), хотя эта конфигурация может быть и переставленной (N-vl-linker-vh-C). В альтернативном случае С-конец переменной области тяжелой цепи присоединен к N-концу линкера scFv, С-конец которого присоединен к N-концу переменной области легкой цепи (N-vl-линкер-vh-C), хотя эту конфигурацию можно переставлять (N-vh-linker-vC). В данном документе рассматриваются scFv в любой ориентации, как и scFv с фрагментами, продлевающими период полувыведения.

[0033] Пептидные линкеры (спейсерные пептиды) можно использовать в контексте антигенсвязывающих доменов и переменных доменов (VH/VL). Пептидный линкер может связывать переменные домены и/или может использоваться для присоединения третьего домена к конструкции антитела. Пептидные линкеры, используемые в контексте данного раскрытия, не обладают полимеризационной активностью. Пептидные линкеры также можно использовать для присоединения других доменов, модулей или областей (таких как домены, продлевающие период полувыведения) к антигенсвязывающему белку, например к биспецифичным конструкциям антител, описанным в настоящем документе. К числу подходящих пептидных линкеров относятся те, которые описаны в патентах США 4751180 и 4935233 или в публикации международного патента WO 88/09344, описание которых полностью включено в настоящее описание ссылкой.

[0034] В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела содержит третий домен, содержащий «Fc», или «Fc-область», или «Fc-домен», который относится к полипептиду, содержащему константную область антитела, за исключением первого иммуноглобулинового домена константной области. Таким образом, «Fc-домен» относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константной области иммуноглобулинов IgE и IgM и гибкой шарнирной области, расположенной со стороны N-конца по отношению к этим доменам. В случае IgA и IgM, Fc может содержать J-цепь. В случае IgG, Fc-домен содержит домены иммуноглобулинов C γ 2 и C γ 3 (C γ 2 и C γ 3) и нижнюю шарнирную область между C γ 1 (C γ 1) и C γ 2 (C γ 2). Предпочтительная конструкция биспецифичного антитела настоящего изобретения основана на антителе IgG (которое включает несколько подклассов, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Хотя границы Fc-области могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется по включению остатков C226 или P230 в ее карбоксильный конец, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых вариантах осуществления в область Fc вносят аминокислотные модификации, например, для изменения связывания с одним или несколькими рецепторами Fc γ R или с рецептором FcRn.

[0035] В некоторых вариантах осуществления препарат, описанный в настоящем

документе, содержит конструкцию биспецифичного антитела, содержащую первый связывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки. В любом из аспектов, описанных в настоящем документе, поверхностный антиген клетки-мишени представляет собой CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFR, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, MUC17 или CLDN18.2. Конструкция биспецифичного антитела в различных аспектах содержит третий домен, содержащий, в порядке от аминоконца к карбоксильному концу: шарнир-домен СН2-домен СН3-линкер-шарнир-домен СН2-домен СН3. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго связывающих доменов содержит область VH и область VL. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления препараты, описанные в данном документе, содержат конструкцию биспецифичного антитела, которая связывает CD3 человека и CDH19 человека, или CD3 человека и MSLN человека, или CD3 человека и DLL3 человека, или CD3 человека и FLT3 человека, или CD3 человека и EGFRvIII человека, или CD3 человека и BCMA человека, или CD3 человека и PSMA, или CD3 человека и CD33 человека, или CD3 человека и CD19 человека, CD3 человека и CD70 человека, или CD3 человека и MUC17 человека, или CD3 человека и CLDN18.2 человека.

[0036] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит набор из шести CDR, представленных в (a) SEQ ID NO: 24-29, (b) SEQ ID NO: 34-39, (c) SEQ ID NO: 78-83, (d) SEQ ID NO: 10-15, (e) SEQ ID NO: 46-51, (f) SEQ ID NO: 88-93, (g) SEQ ID NO: 67-72, (h) SEQ ID NO: 56-61, (i) SEQ ID NO: 112-117, (j) SEQ ID NO: 100-105, (k) SEQ ID NO: 148-153, SEQ ID NO: 157162, или SEQ ID NO: 166171, или SEQ ID NO: 175-180, (l) SEQ ID NO: 132-137 или (m) SEQ ID NO: 123-128.

[0037] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% , 98%, 99% или 100% идентичных) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30, 40, 84, 16, 17, 52, 94, 73, 62, 118, 154, 163, 172, 181, 106, 138, 143 или 129. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 40, 84, 16, 17, 52, 94, 73, 62, 118, 154, 163, 172, 181, 106, 138, 143 или 129.

[0038] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% , 98%, 99% или 100% идентичных) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, 41, 85, 18, 19, 53, 95, 74, 63, 119, 155, 164, 173, 182, 107, 139, 144 или 130. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит VL, содержащий

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, 41, 85, 18, 19, 53, 95, 74, 63, 119, 155, 164, 173, 182, 107, 139, 144 или 130.

[0039] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит (a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31; (b) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41; (c) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 85; (d) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 или 17, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 или 19; (e) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; (f) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95; (g) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74; (h) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63; (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 118, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119; (j) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, 163, 172 или 181, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, 164, 173 или 182; (k) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107; (l) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 138 или 143, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 139 или 144; или (m) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 129, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 130.

[0040] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит набор из шести CDR, представленных в SEQ ID NO: 1-6.

[0041] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен

конструкции биспецифичного антитела содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% (например, идентичную на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% , 98%, 99% или 100%) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

[0042] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% (например, идентичную на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% , 98%, 99% или 100%) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции биспецифичного антитела содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

[0043] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

[0044] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает CD19, содержащий переменный домен легкой цепи, специфичный к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 87.

[0045] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает MSLN, содержащий переменный домен легкой цепи, специфичный к MSLN, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к MSLN, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный

ID NO: 30, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

[0049] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает ВСМА, содержащий вариабельный домен легкой цепи, специфичный к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 97.

[0050] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает PSMA, содержащий вариабельный домен легкой цепи, специфичный к PSMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 или 107, и вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный к PSMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118 или 106, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 или 108, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 121, 122, 109, 110 или 111.

[0051] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного

антитела содержит первый связывающий домен, который связывает CD33, содержащий переменный домен легкой цепи, специфичный к CD33, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или 19, и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD33, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189 или 190, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23.

[0052] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает CDH19, содержащий переменный домен легкой цепи, специфичный к CDH19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CDH19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55.

[0053] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает MUC17, содержащий переменный домен легкой цепи, специфичный к MUC17, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, 164, 173 или 182, и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к MUC17, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, 163, 172 или 181, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в вариантах осуществления конструкции биспецифичного антитела она содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 195 (необязательно с доменом Fc, содержащим

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196). В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, 165, 174 или 183.

[0054] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает cldn18.2, содержащий переменный домен легкой цепи, специфичный к cldn18.2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или 144, и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к cldn18.2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или 143, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или 145, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141, 142, 146 или 147.

[0055] В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывает CD70, содержащий переменный домен легкой цепи, специфичный к CD70, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD70, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, специфичный к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в вариантах осуществления конструкции биспецифичного антитела она содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 192 (необязательно с доменом Fc, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193). В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 131.

[0056] В некоторых вариантах осуществления концентрация конструкции антитела (например, конструкции биспецифичного антитела) в препарате составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл (например, от примерно 1 мг/мл до примерно 8 мг/мл, или от примерно 1 мг/мл до примерно 5 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления концентрация конструкции антитела (например, конструкции биспецифичного антитела) в препарате составляет примерно 1 мг/мл, примерно 2 мг/мл, примерно 3 мг/мл, примерно 4 мг/мл, примерно 5 мг/мл, примерно 6 мг/мл, примерно 7 мг/мл, примерно 8 мг/мл,

примерно 9 мг/мл, примерно 10 мг/мл, примерно 11 мг/мл, примерно 12 мг/мл, примерно 13 мг/мл, примерно 14 мг/мл, примерно 15 мг/мл, примерно 16 мг/мл, примерно 17 мг/мл, примерно 18 мг/мл, примерно 19 мг/мл или примерно 20 мг/мл.

[0057] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен препарат, содержащий конструкцию биспецифичного антитела, которая одновременно взаимодействует с CD3 Т-клеток человека и одним из CDH19 человека, MSLN человека, DLL3 человека, FLT3 человека, EGFRvIII человека, BCMA человека, PSMA человека, CD33 человека, CD19 человека, CD70 человека, CLDN18.2 человека или MUC17 человека таким образом, чтобы временно соединить злокачественные клетки с Т-клетками, тем самым индуцируя опосредованное Т-клетками уничтожение связанной злокачественной клетки. Препарат предпочтительно содержит примерно 1-20 мг/мл конструкции биспецифичного антитела, буфер, сахарид, поверхностно-активное вещество и метионин при молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X, где pH препарата находится в пределах примерно 4-7 (например, примерно 4-6, например, примерно 4,2).

Буферы

[0058] Буферные средства часто используются, чтобы контролировать pH препарата. Препарат настоящего изобретения содержит буфер, который, необязательно, может быть ацетатным буфером, глутаматным буфером, цитратным буфером, лактатным буфером, сукцинатным буфером, тартратным буфером, фумаратным буфером, малеатным буфером, гистидиновым буфером или фосфатным буфером (или их комбинацией). В различных вариантах осуществления буфер представляет собой глутаматный буфер. pH препарата, необязательно, составляет от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6, например, примерно 4,2).

[0059] Буфер может присутствовать в любом количестве, подходящем для поддержания pH препарата на заранее заданном уровне. Концентрация буфера может составлять от примерно 0,1 мМ до примерно 1000 мМ (1 М), или от примерно 5 мМ до примерно 200 мМ, или от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ, или от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ. Подходящие концентрации буфера охватывают концентрации, составляющие примерно 200 мМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера в препарате составляет примерно 190 мМ, примерно 180 мМ, примерно 170 мМ, примерно 160 мМ, примерно 150 мМ, примерно 140 мМ, примерно 130 мМ, примерно 120 мМ, примерно 110 мМ, примерно 100 мМ, примерно 80 мМ, примерно 70 мМ, примерно 60 мМ, примерно 50 мМ, примерно 40 мМ, примерно 30 мМ, примерно 20 мМ, примерно 10 мМ или примерно 5 мМ. В некоторых вариантах концентрация буфера составляет не менее 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700 или 900 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет от примерно 1, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 мМ до 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера

составляет от примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 или 40 мМ до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера (например, глутаматного буфера) составляет примерно 10 мМ.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ)

[0060] Препарат, описываемый в настоящем документе, в различных вариантах осуществления содержит ПАВ. ПАВ необязательно представляет собой неионогенное ПАВ. Примеры ПАВ включают, но не ограничиваются ими, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, поллоксамер 188, поллоксамер 407, Triton™ X-100, полиоксиэтилен, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 или их комбинацию. В различных аспектах ПАВ представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 или полисорбат 80. В иллюстративном варианте осуществления ПАВ представляет собой полисорбат 80.

[0061] Различные препараты, описываемые в настоящем документе, содержат по меньшей мере одно ПАВ либо по отдельности, либо в виде смеси в различных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления концентрация ПАВ составляет от примерно 0,001% до примерно 5% масс./об. (или от примерно 0,001% до примерно 0,5%, или от примерно 0,004 до примерно 0,5% масс./об.). В некоторых вариантах осуществления концентрация ПАВ в препарате составляет не менее 0,001, не менее 0,002, не менее 0,003, не менее 0,004, не менее 0,005, не менее 0,007, не менее 0,01, не менее 0,05, не менее 0,1, не менее 0,2, не менее 0,3, не менее 0,4, не менее 0,5, не менее 0,6, не менее 0,7, не менее 0,8, не менее 0,9, не менее 1,0, не менее 1,5, не менее 2,0, не менее 2,5, не менее 3,0, не менее 3,5, не менее 4,0 или не менее 4,5% масс./об. В некоторых вариантах осуществления концентрация ПАВ в препарате составляет от примерно 0,001% до примерно 0,5% масс./об. (например, от примерно 0,001 до примерно 0,01% масс./об.). В некоторых вариантах осуществления концентрация ПАВ в препарате составляет от примерно 0,001%, примерно 0,002%, примерно 0,003%, примерно 0,004%, примерно 0,005%, примерно 0,006%, примерно 0,007%, примерно 0,008%, примерно 0,009%, примерно от 0,01%, примерно 0,05%, примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, до примерно 0,5% масс./об. В некоторых вариантах осуществления концентрация ПАВ в препарате составляет от примерно 0,001% до примерно 0,01% масс./об. В некоторых вариантах осуществления ПАВ представляет собой полисорбат-80, и при этом концентрация полисорбата-80 составляет примерно 0,01% масс./об.

Сахариды

[0062] Описываемый в данном документе препарат содержит сахарид. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, сорбит, маннит или ксилит или их комбинацию.

[0063] В некоторых вариантах осуществления концентрация сахарада в препарате составляет от примерно 0,01% до примерно 40% масс./об., или от примерно 0,1% до примерно 20% масс./об., или от примерно 1% до примерно 15%, или от примерно 5% до

примерно 12% или от примерно 7% до примерно 12% масс./об. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит по меньшей мере один сахарид, концентрация которого составляет не менее 0,5%, не менее 1%, не менее 2%, не менее 3%, не менее 4%, не менее 5%, не менее 6%, не менее 7%, не менее 8%, не менее 9%, не менее 10%, не менее 11%, не менее 12%, не менее 13%, не менее 14%, не менее 15%, не менее 16%, не менее 17%, не менее 18%, не менее 19%, не менее 20%, не менее 30% или не менее 40% масс./об. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит по меньшей мере один сахарид, концентрация которого составляет примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14% или примерно 15% масс./об. В еще одном варианте осуществления фармацевтический препарат содержит по меньшей мере один сахарид, концентрация которого составляет примерно 7%, примерно 7,5%, примерно 8%, примерно 8,5%, примерно 9%, примерно 9,5%, примерно 10%, примерно 10,5%, примерно 11%, примерно 11,5% или примерно 12% масс./об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит по меньшей мере один сахарид, концентрация которого составляет от примерно 7% до примерно 12% масс./об. В некоторых вариантах осуществления концентрация сахарада (например, сахарозы) в препарате составляет примерно 9% масс./об.

Метионин

[0064] Препарат настоящего изобретения содержит метионин. Метионин присутствует в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 5X до примерно 5000X, например, от примерно 5X до примерно 4200X, от примерно 10X до примерно 5000X или от примерно 10X до примерно 4200X. В различных аспектах метионин присутствует в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела примерно от 50X (например, 105X) до примерно 5000X. Например, метионин может присутствовать в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 100X до примерно 4500X, от примерно 5X до примерно 1000X, от примерно 10X до примерно 2500X, от примерно 100X до примерно 1500X, от примерно 200X до примерно 2500X или от примерно 500X до примерно 1500X. Метионин может присутствовать в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела более 5X, 10X, 20X, 100X, 105X, 200X, 500X, 1000X, 2000X, 4000X, 4200X, 4500X или 5000X (например, больше или равном любому из этих значений). Метионин может присутствовать в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела не более 5X, 10X, 20X, 100X, 200X, 500X, 1000X, 2000X, 4000X, 4200X, 4500X или 5000X. Например, в иллюстративном аспекте изобретения соотношение метионина и конструкции биспецифичного антитела составляет не менее примерно 105X, и конструкция биспецифичного антитела необязательно содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 67-72 и SEQ ID NO: 1-6 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. Способы определения молярного соотношения хорошо известны в данной области

техники; например, если концентрация конструкции биспецифичного антитела равна 2,5 мг/мл, то с 0,125 мМ метионина это дает молярное соотношение 5,25, с 0,25 мМ метионина это дает молярное соотношение 10,5, с 0,5 мМ метионина это дает молярное соотношение 21, с 2,5 мМ метионина это дает молярное соотношение 105, с 5 мМ метионина это дает молярное соотношение 210, с 12,5 мМ метионина это дает молярное соотношение 525, с 25 мМ метионина это дает молярное соотношение 1050, с 50 мМ метионина это дает молярное соотношение 2100, и с 100 мМ метионина это дает молярное соотношение 4200. В различных аспектах препарат содержит от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ (например, от примерно 20 мМ до примерно 150 мМ, от примерно 25 мМ до примерно 75 мМ или от примерно 50 мМ до примерно 100 мМ) метионина. В различных аспектах препарат содержит примерно 50 мМ метионина.

[0065] Термин «агрегат» обычно относится к более высокомолекулярным (НМВ) белковым частицам, а не к желаемым определенным частицам (например, мономеру). Этот термин используется здесь взаимозаменяемо с терминами «высокомолекулярные частицы» и «НМВ» (т.е. молекулы, имеющие более высокую молекулярную массу, чем молекулы чистого продукта). Белковые агрегаты, как правило, могут отличаться по размеру (в диапазоне от небольших (димеры) до крупных скоплений (невидимые или даже видимые частицы) и с диаметром от нанометрового до микрометрового), по морфологии (от примерно сферической до фибриллярной), по структуре белка (нативная или ненативная/денатурированная), по типу межмолекулярной связи (ковалентная или нековалентная), по обратимости и растворимости. Растворимые агрегаты охватывают диапазон размеров примерно от 1 до 100 нм, а размеры белковых частиц охватывают почти невидимые (~0,1-100 нм) и видимые (>100 нм) диапазоны. Термин «агрегат» относится ко всем видам физически связанных или химически связанных ненативных видов двух или более белковых мономеров, включая аморфные агрегаты, олигомеры, мультимеры и т.п. Термин «агрегация» относится к прямому взаимному притяжению между молекулами, например, с помощью сил Ван-дер-Ваальса или путем образования химической связи.

[0066] Как описано в примере, добавление метионина к препарату, содержащему конструкцию биспецифичного антитела, позволяет хранить препарат в форме замороженного препарата при температуре примерно от -10°C до примерно -40°C (например, при температуре примерно от -20°C до примерно -35°C или примерно -30°C) без возникновения уровня агрегации на том уровне, который возникает при отсутствии метионина в препарате. Стабильность препарата конструкции биспецифичного антитела можно количественно оценивать несколькими способами, включая эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-ВЭЖХ), эксклюзионную ультра высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-УВЭЖХ), катионообменную высокоэффективную жидкостную хроматографию (СЕ-ВЭЖХ), динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование (AUC), проточное фракционирование в силовом поле (FFF), изоэлектрическое фокусирование и

ионообменную хроматографию (ИEX). Предпочтительным методом определения присутствия НМВ частиц в препарате на основе конструкции биспецифичного антитела является SE-УВЭЖХ. Типичные условия для проведения анализа SE-УВЭЖХ приведены в примере. Например, образование НМВ частиц или скорость увеличения уровня НМВ частиц в конструкции биспецифичного антитела можно определить в разные моменты времени. Например, уровень НМВ частиц можно определять при хранении в течение одной недели, двух недель, четырех недель, трех месяцев, шести месяцев, двенадцати месяцев, восемнадцати месяцев или двух лет при температуре примерно от -10°C до -40°C (например, -15°C , что соответствует условиям ускоренного старения при хранении при -30°C).

[0067] В некоторых вариантах осуществления относительные параметры любых конкретных частиц конструкции биспецифичного антитела, таких как интактная молекула ViTE® или основные частицы, или высокомолекулярные (НМВ) частицы (т.е. агрегаты), выражены по отношению к соответствующим параметрам всего продукта. Например, в некоторых вариантах осуществления содержание конструкции биспецифичного антитела в виде НМВ частиц в препарате после хранения в течение определенного периода времени (например, четырех недель) при температуре от -10°C до -40°C , например, от -20°C до -35°C (например, -30°C или -15°C) составляет 10% или меньше (например, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5% или меньше). В качестве альтернативы можно сравнить относительные значения конкретных частиц в разных рецептурах препарата, хранящихся в аналогичных условиях. Например, препарат, содержащий метионин, содержит по меньшей мере примерно на 10% меньше НМВ частиц по сравнению с подобным препаратом, не содержащим метионин, который хранился в тех же условиях в течение того же периода времени. В различных аспектах препарат, содержащий метионин, содержит по меньшей мере на 25-85% меньше высокомолекулярных частиц после хранения при температуре от -10°C до -40°C (например, от -20°C до -35°C , -30°C или -15°C) в течение периода времени (например, четырех недель) по сравнению с подобным препаратом, не содержащим метионин, хранившимся в тех же условиях в течение того же периода времени. «Подобный препарат» представляет собой препарат, содержащий те же компоненты в тех же количествах, но не содержащий метионина. В различных аспектах препарат настоящего изобретения содержит от примерно 30% до примерно 75% меньше высокомолекулярных частиц (например, от примерно 25% до примерно 60% или от примерно 30% до примерно 60% меньше высокомолекулярных частиц) после хранения при температуре от -10°C до -40°C (например, от -20°C до -35°C , или -15°C , или -30°C) в течение периода времени (например, четыре недели) по сравнению с подобным препаратом, не содержащим метионин.

[0068] Таким образом, в различных аспектах настоящего изобретения предложен препарат, содержащий от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл конструкции биспецифичного антитела, 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% PS80, 50 мМ метионина

при pH 4,2. В данном раскрытии также предложен замороженный фармацевтический препарат, содержащий от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл конструкции биспецифичного антитела, сахарозу (например, примерно 9% сахарозы), глутаминовую кислоту (например, примерно 10 мМ глутаминовой кислоты), полисорбат 80 (например, примерно 0,01% PS80) и от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ метионина, где pH препарата составляет от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6, например, примерно 4,2).

Терапевтическое использование препарата

[0069] Препарат, описанный в настоящем документе, полезен в качестве фармацевтического препарата для лечения рака или облегчения течения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Термины «субъект, нуждающийся» или «нуждающийся в лечении» включают субъектов, у кого уже имеется заболевание, а также тех, у кого необходимо предупредить развитие заболевания. Нуждающийся в этом субъект или «пациент» или «больной» включает человека или других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Термин «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупреждающим мерам. «Лечение» не требует полной ремиссии или ликвидации болезни; предполагается любое улучшение заболевания и/или улучшение симптомов, связанных с заболеванием. Например, терапевтический ответ будет относиться к одному или нескольким из следующих вариантов улучшения при заболевании: (1) уменьшение числа опухолевых клеток; (2) увеличение гибели опухолевых клеток; (3) ингибирование выживания опухолевых клеток; (4) ингибирование (т.е. замедление до некоторой степени, предпочтительно прекращение) роста опухоли или появления новых поражений; (5) замедление прогрессирования заболевания; (6) повышение выживаемости пациентов; (7) снижение стадии рака (например, со стадии 2 до стадии 1) и/или (8) некоторое облегчение одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или состоянием. «Предупреждение» включает, например, недопущение возникновения или повторного возникновения опухоли или рака. Состояние заболевания контролируют, например, по данным клинического осмотра, рентгенографии, компьютерной томографии (КТ, например, спиральной КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ), позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), УЗИ, эндоскопии и лапароскопии, определению уровня онкомаркеров (см. например, карциноэмбриональный антиген (СЕА)), цитологии, гистологии, биопсии опухоли и/или подсчету опухолевых клеток в кровотоке. Эти методы также обычно используются для диагностики и определения стадии рака.

[0070] В изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы (например, трижды

негативный рак молочной железы), светлоклеточный рак почки, рак шейки матки, рак толстой и прямой кишок, рак эндометрия, рак желудка, плоскоклеточный рак головы/шеи, рак губы и полости рта, рак печени, плоскоклеточный рак легких, меланому, мезотелиому, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), немеланомный рак кожи, рак яичников, рак полости рта, рак поджелудочной железы, рак простаты, нейроэндокринный рак простаты, почечно-клеточный рак, саркому, мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) или рак щитовидной железы.

[0071] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой адренкортикальную опухоль, альвеолярную саркому мягких тканей, карциному, хондросаркому, колоректальную карциному, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эндокринную опухоль, опухоль энтодермального синуса, эпителиоидную гемангиоэндотелиому, саркому Юинга, герминогенную опухоль, гепатобластому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, нефрому, нейробластому, не являющуюся рабдомиосаркомой саркому мягких тканей (NRSTS), остеосаркому, параспинальную саркому, почечно-клеточную карциному, ретинобластому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому или опухоль Вильмса.

[0072] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ).

[0073] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина (ХЛ), мантийноклеточную лимфому (МКЛ), множественную миелому (ММ), миелодиспластический синдром (МДС), неходжкинскую лимфому (НХЛ) или малую лимфоцитарную лимфому (МЛЛ).

[0074] Поддающиеся лечению виды рака включают, но не ограничиваются ими, альвеолярную рабдомиосаркому, рак кости, рак ануса, анального канала или аноректума, рак глаза, рак внутрипеченочных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, рак вульвы, рак пищевода, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак гортаноглотки, рак гортани, рак носоглотки, брюшины, сальника, и рак брыжейки, рак глотки, рак тонкой кишки, нейроэндокринный рак, рак мягких тканей, рак желудка, рак яичек, рак мочеочника и рак мочевого пузыря.

Пути введения

[0075] Предпочтительно фармацевтический препарат вводить парентерально, например внутривенно, подкожно, внутриопухолево или внутримышечно. Парентеральное введение можно осуществлять с помощью инъекции, такой как болюсная инъекция, или с помощью инфузии, такой как непрерывная инфузия. Введение можно осуществлять посредством депо для длительного высвобождения. В некоторых вариантах осуществления препарат вводят внутривенно с помощью исходной болюсной инъекции с последующей непрерывным вливанием для поддержания терапевтических

циркулирующих уровней лекарственного продукта. В некоторых вариантах осуществления препарат вводят в виде однократной дозы. Фармацевтические препараты можно вводить с помощью медицинского устройства. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических препаратов описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

[0076] В различных аспектах препарат замораживают, и способ включает размораживание препарата перед введением субъекту. В альтернативных аспектах препарат лиофилизируют и препарат восстанавливают с помощью соответствующего разбавителя. В этих и других аспектах полученный препарат (размороженный или восстановленный) вводят внутривенно.

Другие способы

[0077] В данном раскрытии дополнительно предложен способ, включающий (a) приготовление препарата, включающего конструкцию биспецифичного антитела, метионин и буфер, где метионин присутствует при молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X (например, от примерно 50X до примерно 5000X); (b) замораживание препарата, полученного на стадии (a); и (c) хранение препарата, полученного на стадии (b), при температуре от примерно -10°C до примерно -40°C . Препарат, полученный на стадии (a), в некоторых вариантах осуществления дополнительно содержит сахарид и имеет pH от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6). Стадии (b) и (c) необязательно проводят при температуре от примерно -20°C до примерно -35°C (например, примерно -30°C), и/или стадия (c) включает хранение препарата в течение по меньшей мере одного месяца. Также, необязательно, способ дополнительно включает (d) размораживание препарата со стадии (c); и (e) лиофилизацию препарата, полученного на стадии (d). Удалять метионин в ходе любой из описанных здесь стадий процесса не нужно. В некоторых аспектах изобретения между стадиями (d) и (e) проводят стадию замены буфера для получения фармацевтического препарата, содержащего конструкцию биспецифичного антитела, сахарид, поверхностно-активное вещество, буфер и метионин в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X (например, от примерно 50X до примерно 5000X), где pH препарата составляет от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6, например, примерно 4,2). Типичные способы замены буфера известны в данной области, включая диализ, ультрафильтрацию и диафильтрацию, гель-фильтрацию и эксклюзионную хроматографию. Альтернативно, в некоторых аспектах изобретения между стадиями (d) и (e) проводят стадию замены буфера с целью удаления метионина из препарата, в результате чего получают фармацевтический препарат, содержащий конструкцию биспецифичного антитела, сахарид, поверхностно-активное вещество и буфер, где pH препарата составляет от примерно 4 до примерно 7 (например, от примерно 4 до примерно 6 или примерно 4,2). В различных аспектах препарат содержит от

примерно 10 мМ до примерно 200 мМ метионина и необязательно содержит от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл конструкции биспецифичного антитела.

[0078] Все особенности, описанные в настоящем документе в отношении препарата данного изобретения, также применимы к данному способу. Например, сахарид может быть моносахаридом или дисахаридом, и его можно выбирать из глюкозы, галактозы, фруктозы, ксилозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, трегалозы, сорбита, маннита или ксилита. Поверхностно-активное вещество можно выбирать из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80, полуксамера 188, полуксамера 407 или Triton™ x-100. Буфер можно выбирать из ацетатного буфера, глутаматного буфера, цитратного буфера, лактатного буфера, сукцинатного буфера, тартратного буфера, фумаратного буфера, малеатного буфера, гистидинового буфера или фосфатного буфера. Конструкция биспецифичного антитела может представлять собой любую из конструкций биспецифичного антитела, описанных в данном документе, например конструкцию биспецифичного антитела, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188.

Наборы

[0079] В качестве дополнительного аспекта в настоящем документе предложены наборы, которые содержат препарат, описанный в настоящем документе, упакованный так, чтобы облегчить его применение для введения субъектам. В одном варианте осуществления такой набор включает препарат, описанный в настоящем документе (например, препарат, содержащий описанную здесь конструкцию биспецифичного антитела), упакованный в контейнер, такой как герметичная бутылка, сосуд, одноразовый или многоразовый флакон, предварительно наполненный шприц, или предварительно наполненное инъекционное устройство, необязательно с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или включенной в упаковку, которая описывает использование препарата при осуществлении способа. В одном аспекте препарат упакован в виде стандартной лекарственной формы. Набор может дополнительно включать устройство, подходящее для введения препарата согласно определенному пути введения. Набор, предпочтительно, содержит этикетку, описывающую применение описанного здесь препарата.

[0080] Изобретение далее описано в следующем примере. Пример служит только для иллюстрации изобретения и никоим образом не предназначен для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[0081] Следующий пример демонстрирует стабильность препарата на основе конструкции биспецифичного антитела настоящего изобретения после хранения при температуре от -10°C до -40°C (например, при -15°C) в течение четырех недель.

[0082] Были приготовлены составы, содержащие 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% PS80, 50 мМ метионина, pH 4,2, каждый из которых содержал одну из следующих конструкций биспецифичного антитела: ViTE®-1 (PSMAxCD3), ViTE®-2 (MSLNxCD3), ViTE®-3 (CD19xCD3), ViTE®-4 (CD33xCD3), ViTE®-5 (DLL3xCD3), ViTE®-6 (FLT3xCD3), ViTE®-7 (BCMAxCD3) и ViTE®-8 (CLDN18.2xCD3). Конечная концентрация белка для каждого из ViTE®-1, ViTE®-2, ViTE®-3, ViTE®-4, ViTE®-6, ViTE®-7 и ViTE®-8 в соответствующих им составах составляла 1,5 мг/мл. Конечная концентрация белка ViTE®-5 составляла 3,75 мг/мл.

[0083] Образцы белка выдерживали при -20°C в течение 24 часов для полного замораживания. Затем образцы хранили при -15°C в течение четырех недель. Параллельно дополнительные образцы хранили при 4°C и 40°C , чтобы охарактеризовать стабильность жидкого препарата с метионином. Некоторые образцы лиофилизировали для оценки влияния метионина на лиофилизированный осадок. Лиофилизированные образцы хранили при 4°C и 40°C .

[0084] Образцы в момент времени 0 и образцы, подвергавшиеся ускоренному старению, оценивали на содержание НМВ с помощью эксклюзионной ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-УВЭЖХ). Принцип разделения белков с помощью SE-УВЭЖХ основан на их разном гидродинамическом объеме. Молекулы с более высокими гидродинамическими объемами элюируются раньше, чем молекулы с меньшими объемами. Образцы загружали на колонку SE-УВЭЖХ (VEN200, $4,6 \times 300$ мм (Waters Corporation, 186005226)), разделяли в изократическом режиме и элюент контролировали по поглощению в УФ. Чистоту определяли путем расчета процентного содержания каждого выделенного компонента по отношению к общей интегрированной площади. Настройки SE-УВЭЖХ были следующими: Расход: 0,4 мл/мин; Время прогона: 12 мин; УФ обнаружение: 280 нм; Температура колонки: к.т.; Целевая белковая загрузка: 6 мкг; Проточная кювета, совместимая с белками: 5 мм.

[0085] Как показано на фигуре 1, добавление метионина снижало уровни агрегации в замороженном состоянии для различных конструкций биспецифичных антител, протестированных после хранения в течение одного месяца при -15°C , что соответствует условиям ускоренного тестирования для хранения при -30°C . В типичном эксперименте добавление метионина уменьшало появление частиц НМВ примерно на 25-85%: Содержание частиц НМВ ViTE®-1 сократилось примерно на 30%, содержание частиц НМВ ViTE®-2 сократилось примерно на 27%, содержание частиц НМВ ViTE®-3 сократилось примерно на 36%, содержание частиц НМВ ViTE®-4 сократилось примерно на 75%, содержание частиц НМВ ViTE®-5 сократилось примерно на 80%, содержание частиц НМВ ViTE®-7 сократилось примерно на 76%, а содержание частиц НМВ ViTE®-

8 сократилось примерно на 60%.

[0086] Ингибирующее действие метионина на агрегацию замороженных составов было неожиданным, по крайней мере частично, потому что метионин не проявлял аналогичного действия на жидкие составы. Влияние метионина на стабильность в жидком состоянии оценивали после хранения в течение четырех недель при 4°C и 40°C, причем было установлено, что формообразующее не влияло на стабильность тестируемых конструкций биспецифичных антител в жидком продукте. См. фигуру 2 и фигуру 3. Процентное содержание частиц НМВ, обнаруженных в образцах, хранившихся в течение четырех недель при 4°C, практически не зависело от присутствия метионина в препарате (сравните второй и четвертый столбцы на фигуре 2). Аналогичные результаты наблюдались в условиях ускоренного хранения в течение четырех недель при 40°C (сравните второй и четвертый столбцы на фигуре 3).

[0087] В некоторых случаях терапевтические белковые составы лиофилизируют для хранения или транспортировки. Влияние метионина на стабильность лиофилизированных продуктов оценивали после хранения в течение четырех недель при 4°C и 40°C. См. фигуры 4 и 5. Более высокая температура соответствует условиям ускоренного испытания стабильности. Было установлено, что метионин не влияет на стабильность исследуемых конструкций биспецифичных антител в лиофилизированном состоянии (сравните второй и четвертый столбцы для каждой конструкции на фигурах 4 и 5).

[0088] Добавление других аминокислот и формообразующих к буферу в препарате, содержащему молекулу ViTE, 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% PS80, не приводило к значительному снижению уровней агрегации в замороженном состоянии после месячного хранения при -20°C (фигуры 6А, 6В и 6С). Концентрация всех исследуемых белков была 1 мг/мл. Концентрация аминокислоты в опыте, представленном на фигуре 6А, составляла 10 мМ, а концентрация формообразующего в опытах, представленных на фигурах 6В и 6С, составляла 50 мМ.

[0089] Данные, представленные в этом примере, демонстрируют стабильность препарата настоящего изобретения, содержащего метионин, при температуре от -10°C до -40°C (например, от -20°C до -35°C, например -30°C) для различных конструкций биспецифичных антител. Интересно, что метионин существенно не ингибировал агрегацию в жидких препаратах и не влиял на стабильность лиофилизированных препаратов.

Пример 2

[0090] *Получение образцов:* Соответствующие объемы исходных растворов 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% PS80, 200 мМ метионина (рН 4,2) добавляли к 5 мг/мл ViTE®-5 (DLL3хCD3) (SEQ ID NO: 77) образцу для получения конечного препарата, содержавшего 10 мМ глутамата, 9% сахарозы, 0,01% PS80, рН 4,2, при различных концентрациях метионина. Конечная концентрация белка ViTE®-5 составляла 2,5 мг/мл. Все белковые образцы выдерживали при температуре -20°C в течение 24 часов для

полного замораживания. Затем образцы хранили при -15°C в течение 4 недель. Образцы t0 и образцы, подвергавшиеся ускоренному старению, оценивали на содержание НМВ с помощью SE-УВЭЖХ.

[0091] *Анализ SE-УВЭЖХ*: Стабильность образцов анализировали с помощью SE-УВЭЖХ (эксклюзионной ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии) для определения уровня агрегации в замороженном состоянии. Принцип разделения белков с помощью эксклюзионной ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-УВЭЖХ) основан на их разном гидродинамическом объеме. Молекулы с более высоким гидродинамическим объемом элюируются раньше, чем молекулы с меньшими объемами. Образцы загружают на колонку SE-УВЭЖХ (VEN200, $4,6 \times 300$ мм (Waters Corporation, 186005226)), разделяют в изократическом режиме и элюент контролируют по поглощению в УФ. Чистоту определяют путем расчета процентного содержания каждого выделенного компонента по отношению к общей интегрированной площади. Используют следующие настройки SE-UHPLC: Расход: 0,4 мл/мин, время прогона: 12 мин, УФ-обнаружение: 280 нм, температура колонки: к.т.; целевая белковая загрузка: 6 мкг, проточная кювета, совместимая с белками: 5 мм.

[0092] *Результаты*: Было обнаружено, что молярное соотношение метионина и ViTE, равное 105 и выше, снижает агрегацию ViTE®-5 в замороженном состоянии (фигура 7). Соотношения ниже 105 не защищали от агрегации в замороженном состоянии в той степени, в какой это наблюдалось при молярных соотношениях не ниже 105.

[0093] Все ссылки, цитируемые здесь, включая патенты, патентные заявки, литературные публикации и т.п., настоящим полностью включены ссылкой.

Хотя данное изобретение было описано с упором на предпочтительные варианты осуществления, специалистам в данной области будет очевидно, что могут быть использованы варианты предпочтительных соединений и способов, и что предполагается, что изобретение может быть осуществлено иначе, чем в данном здесь описании. Соответственно, это изобретение включает все модификации, охватываемые сущностью и объемом изобретения, как определено следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический препарат, содержащий
 - (a) конструкцию биспецифичного антитела,
 - (b) сахарид,
 - (c) поверхностно-активное вещество,
 - (d) буфер, и
 - (e) метионин, который присутствует в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X;
где рН препарата составляет от примерно 4 до примерно 7.
2. Препарат по п. 1, где рН препарата составляет примерно 4,2.
3. Препарат по п. 1 или п. 2, где сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид.
4. Препарат по любому из пп. 1-3, где сахарид представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, сорбит, маннит или ксилит.
5. Препарат по п. 4, где сахарид представляет собой сахарозу.
6. Препарат по любому из пп. 1-5, где поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество.
7. Препарат по любому из пп. 1-6, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, полоксамер 188, полоксамер 407 или Triton™ x-100.
8. Препарат по п. 7, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 или полисорбат 80.
9. Препарат по п. 7, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.
10. Препарат по любому из пп. 1-9, где буфер представляет собой ацетатный буфер, глутаматный буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, сукцинатный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, малеатный буфер, гистидиновый буфер или фосфатный буфер.
11. Препарат по п. 10, где буфер представляет собой глутаматный буфер.
12. Препарат по любому из пп. 1-11, где концентрация конструкции биспецифичного антитела в препарате составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл.
13. Препарат по любому из пп. 1-12, где препарат содержит метионин при молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 50X до примерно 5000X.
14. Препарат по любому из пп. 1-12, где препарат содержит от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ метионина.
15. Препарат по любому из пп. 1-14, где препарат заморожен.
16. Препарат по любому из пп. 1-14, где препарат представляет собой размороженный препарат.

17. Препарат по любому из пп. 1-14, где препарат является лиофилизированным.
18. Препарат по любому из пп. 1-17, который содержит не менее чем примерно на 10% меньше высокомолекулярных (НМВ) частиц по сравнению с подобным препаратом, не содержащим метионин, при хранении в течение четырех недель при -15°C.
19. Препарат по п. 18, который содержит не менее чем примерно на 25-85% меньше высокомолекулярных (НМВ) частиц по сравнению с подобным препаратом, не содержащим метионин, при хранении в течение четырех недель при -15°C.
20. Замороженный фармацевтический препарат, содержащий от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл конструкции биспецифичного антитела, сахарозу, глутаминовую кислоту, полисорбат 80 и от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ метионина, где рН препарата составляет от примерно 4 до примерно 7.
21. Препарат по любому из пп. 1-20, где конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки.
22. Препарат по п. 21, дополнительно содержащий третий домен, содержащий в порядке от amino-конца к карбоксильному концу: шарнирную область-домен СН2-домен Сh3-линкер-шарнирную область-домен СН2-домен СН3.
23. Препарат по п. 22, где каждый из первого и второго связывающих доменов содержит область VH и область VL.
24. Препарат по п. 22 или п. 23, где конструкция биспецифичного антитела представляет собой конструкцию одноцепочечного антитела.
25. Препарат по любому из пп. 21-24, где поверхностный антиген клетки-мишени представляет собой CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFR, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, MUC17 или CLDN18.2.
26. Препарат по любому из пп. 21-25, где конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188.
27. Препарат по любому из пп. 1-26, где содержание метионина в препарате соответствует молярному соотношению метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 105X до примерно 5000X, и конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77.
28. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту препарата по любому из пп. 1-26.

29. Способ по п. 28, где препарат замораживают, и способ дополнительно включает размораживание препарата перед введением субъекту.

30. Способ по п. 27 или 28, где указанный способ включает внутривенное введение препарата субъекту.

31. Способ по любому из пп. 28-30, где содержание метионина в препарате соответствует молярному соотношению метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 105X до примерно 5000X, и конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77.

32. Способ, включающий

(а) приготовление препарата, включающего конструкцию биспецифичного антитела, метионин и буфер, где метионин присутствует в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X;

(b) замораживание препарата, полученного на стадии (а); и

(с) хранение препарата, полученного на стадии (b), при температуре от примерно -10°C до примерно -40°C.

30. Способ по п. 29, где способ дополнительно включает

(d) размораживание препарата со стадии (с); и

(е) лиофилизацию препарата, полученного на стадии (d).

33. Способ по п. 32, где препарат со стадии (а) дополнительно содержит сахарид и имеет рН от примерно 4 до примерно 7.

34. Способ по п. 33, где между стадиями (d) и (е) проводят стадию замены буфера для получения фармацевтического препарата, содержащего конструкцию биспецифичного антитела, сахарид, поверхностно-активное вещество, буфер и метионин, присутствующий в молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 10X до примерно 5000X; где рН препарата составляет от примерно 4 до примерно 7.

35. Способ по любому из пп. 32-34, где стадии (b) и (с) проводят при температуре от примерно -20°C до примерно -35°C.

36. Способ по любому из пп. 32-35, где стадия (с) включает хранение препарата в течение по меньшей мере одного месяца.

37. Способ по любому из пп. 32-36, где препарат содержит метионин при молярном соотношении метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 50X до примерно 5000X.

38. Способ по любому из пп. 32-37, где препарат содержит от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ метионина.

39. Способ по любому из пп. 33-38, где сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид.

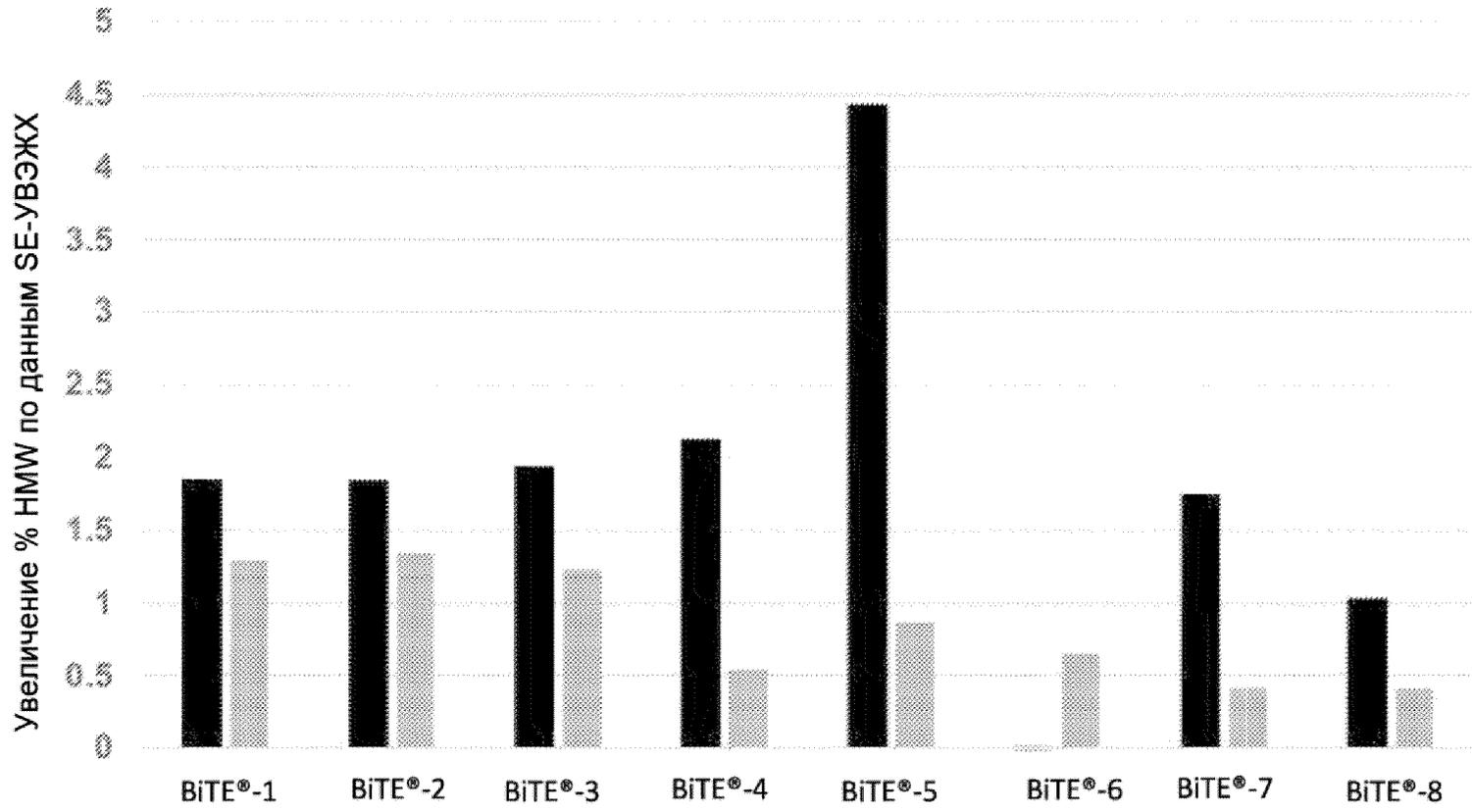
40. Способ по любому из пп. 33-39, где сахарид представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, сорбит, маннит или

ксилит.

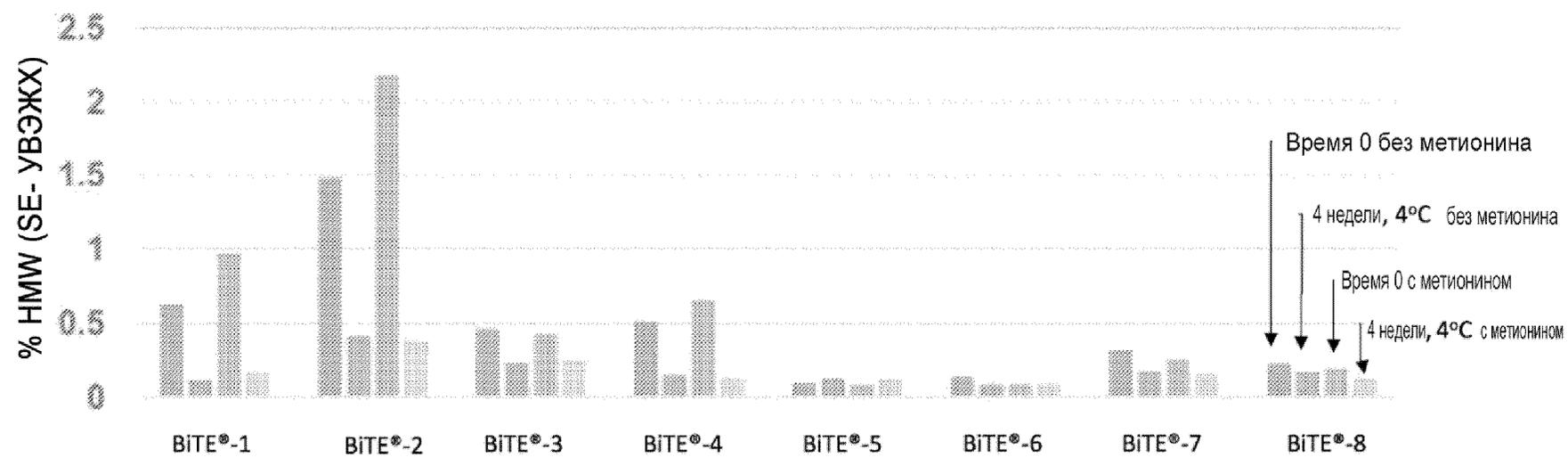
41. Способ по п. 40, где сахарид представляет собой сахарозу.
42. Способ по любому из пп. 34-41, где поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество.
43. Способ по любому из пп. 34-42, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, полочсамер 188, полочсамер 407 или Triton™ x-100.
44. Способ по п. 43, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.
45. Способ по любому из пп. 32-44, где буфер представляет собой ацетатный буфер, глутаматный буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, сукцинатный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, малеатный буфер, гистидиновый буфер или фосфатный буфер.
46. Способ по п. 45, где буфер представляет собой глутаматный буфер.
47. Способ по любому из пп. 31-46, где концентрация конструкции биспецифичного антитела в препарате составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 20 мг/мл.
48. Способ по любому из пп. 31-47, где конструкция биспецифичного антитела содержит первый связывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки.
49. Способ по п. 48, дополнительно включающий третий домен, содержащий, в порядке от amino-конца к карбоксильному концу: шарнирную область-домен CH2-домен Ch3-линкер-шарнирную область-домен CH2-домен CH3.
50. Способ по п. 49, где каждый из первого и второго связывающих доменов содержит область VH и область VL.
51. Способ по п. 49 или п. 50, где конструкция биспецифичного антитела представляет собой конструкцию одноцепочечного антитела.
52. Способ по любому из пп. 48-51, где поверхностный антиген клетки-мишени представляет собой CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFR, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, MUC17 или CLDN18.2.
53. Способ по любому из пп. 48-52, где конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188.

54. Способ по п. 53, где содержание метионина в препарате соответствует молярному соотношению метионина и конструкции биспецифичного антитела от примерно 105X до примерно 5000X, и конструкция биспецифичного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77.

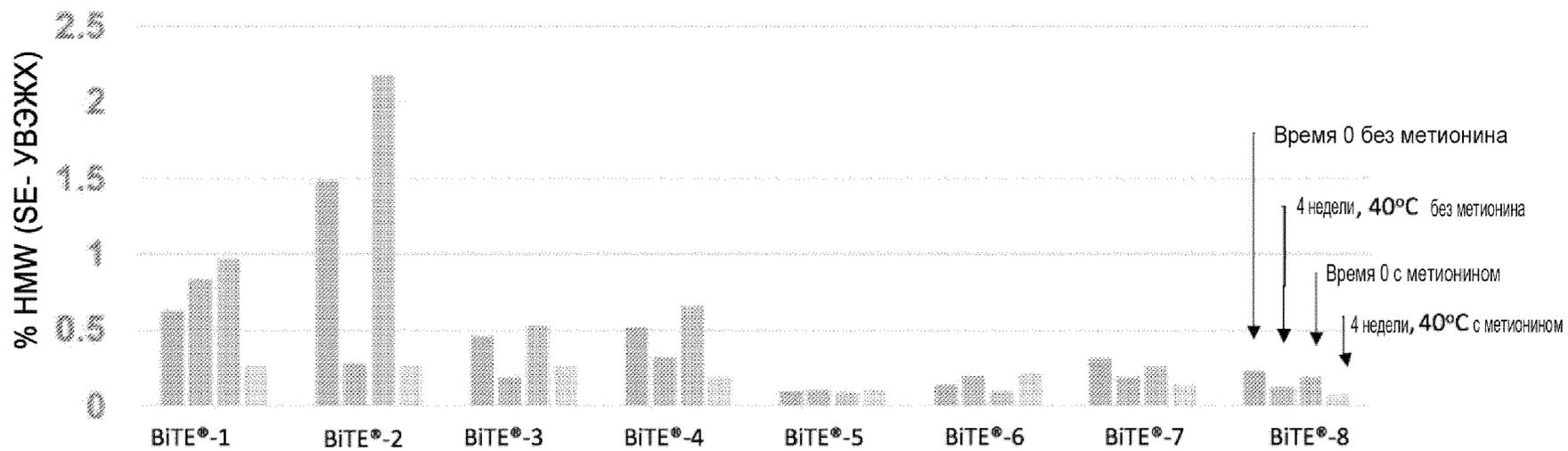
По доверенности



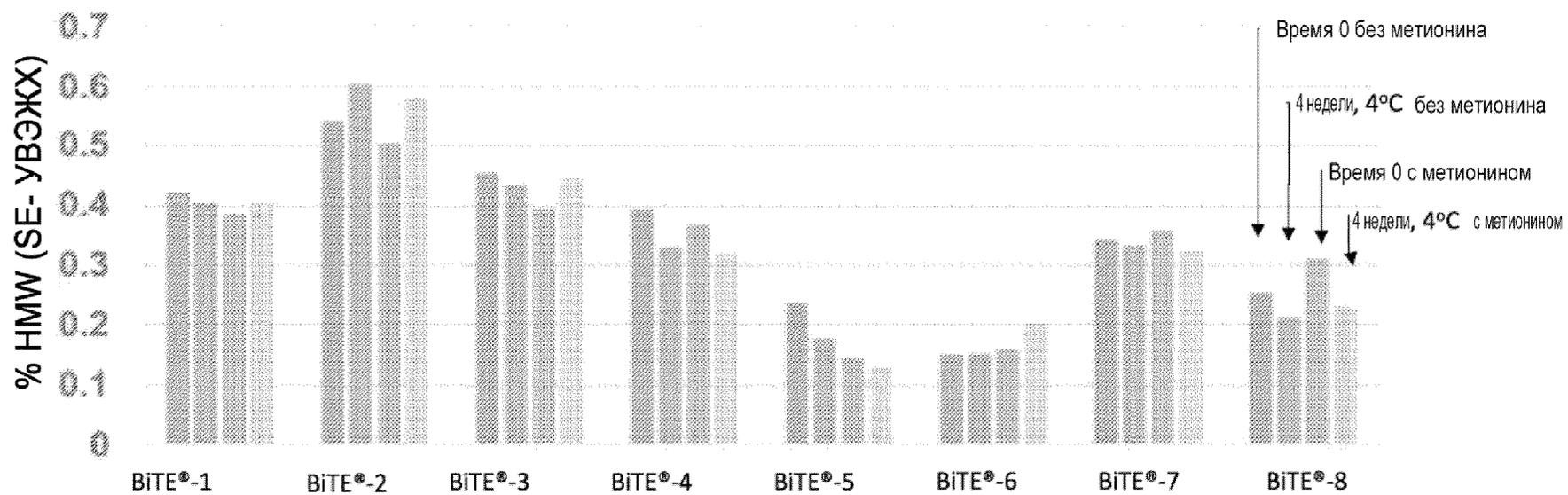
ФИГУРА 1



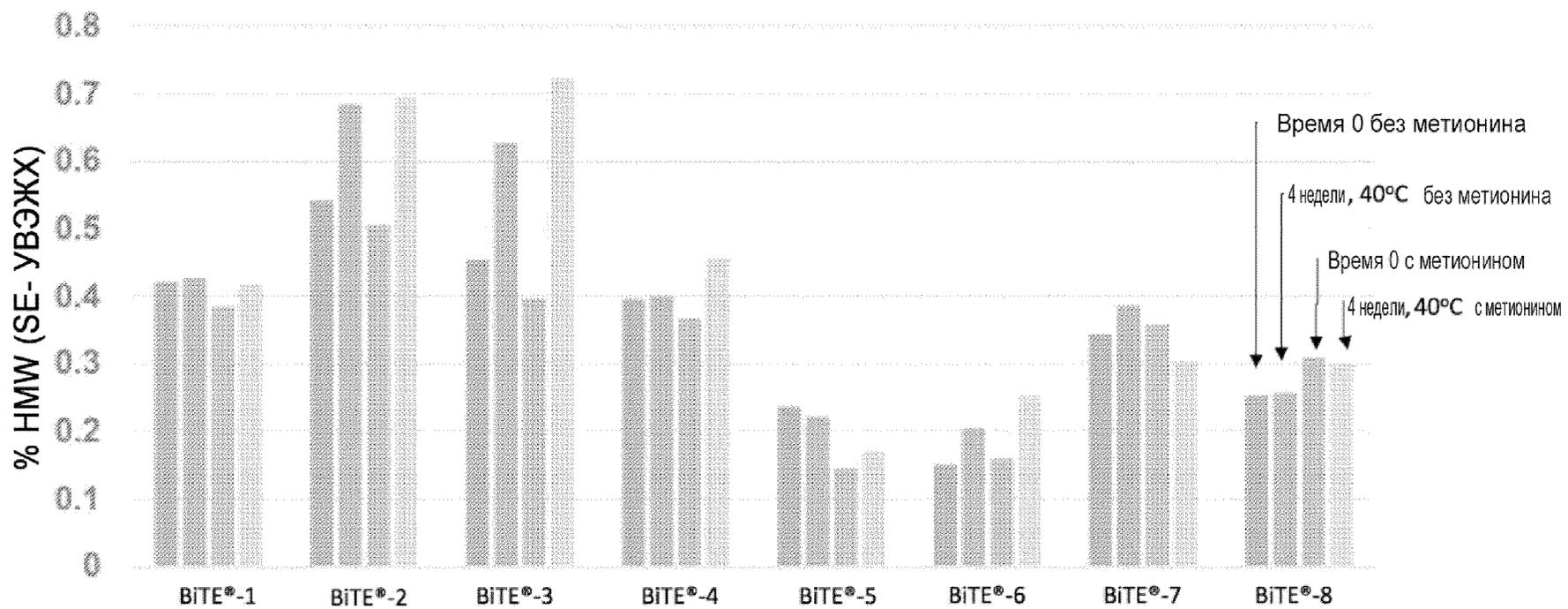
ФИГУРА 2



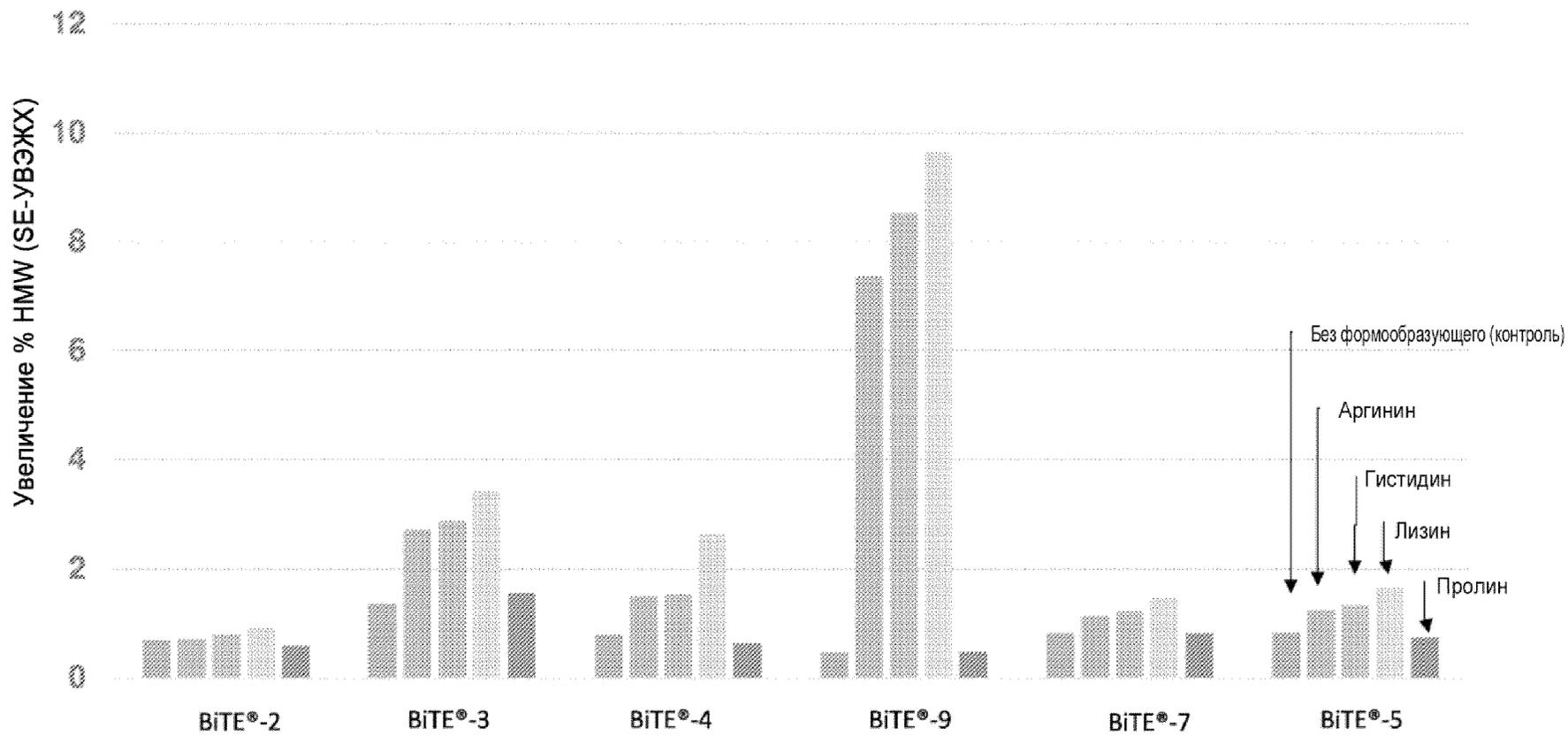
ФИГУРА 3



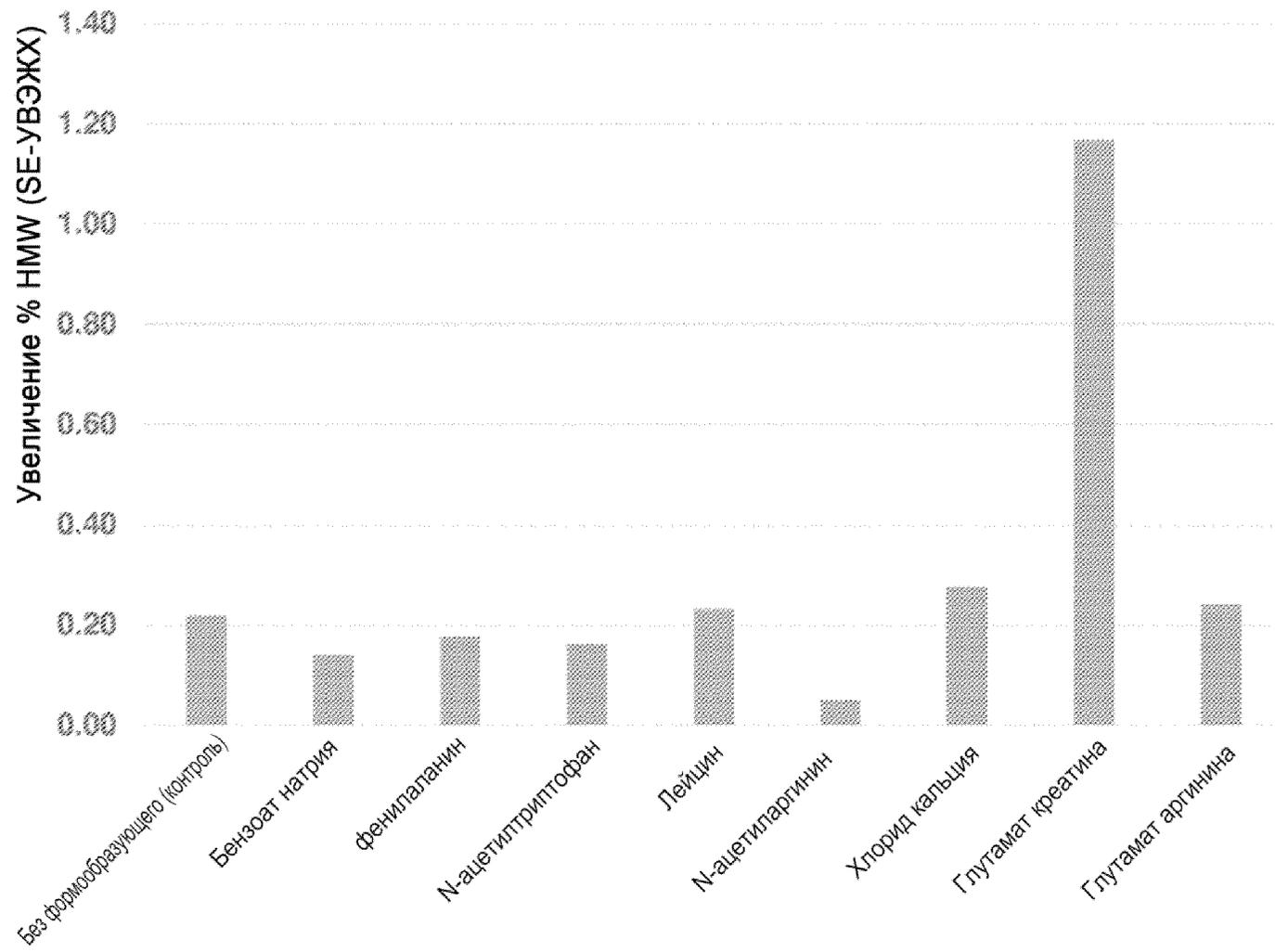
ФИГУРА 4



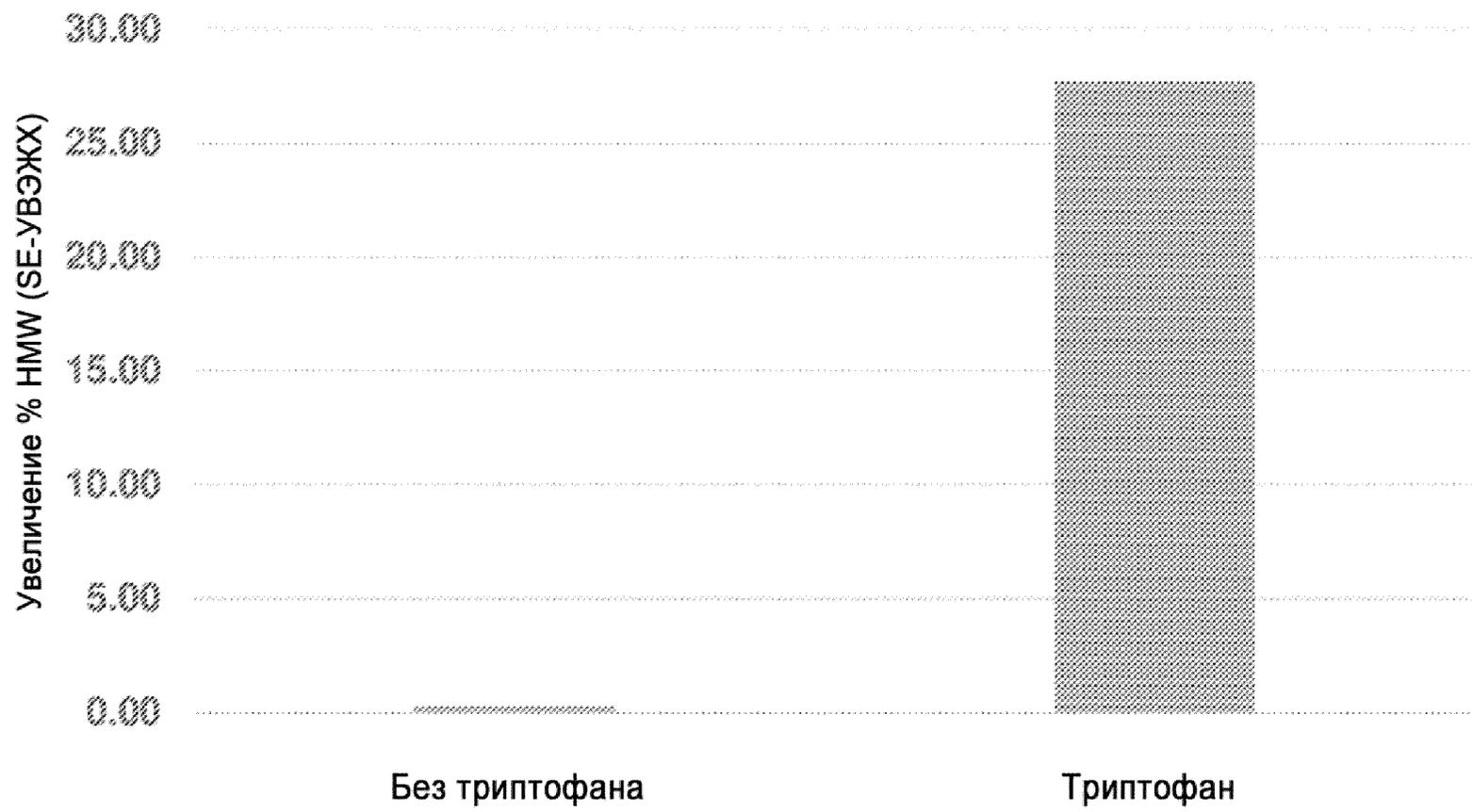
ФИГУРА 5



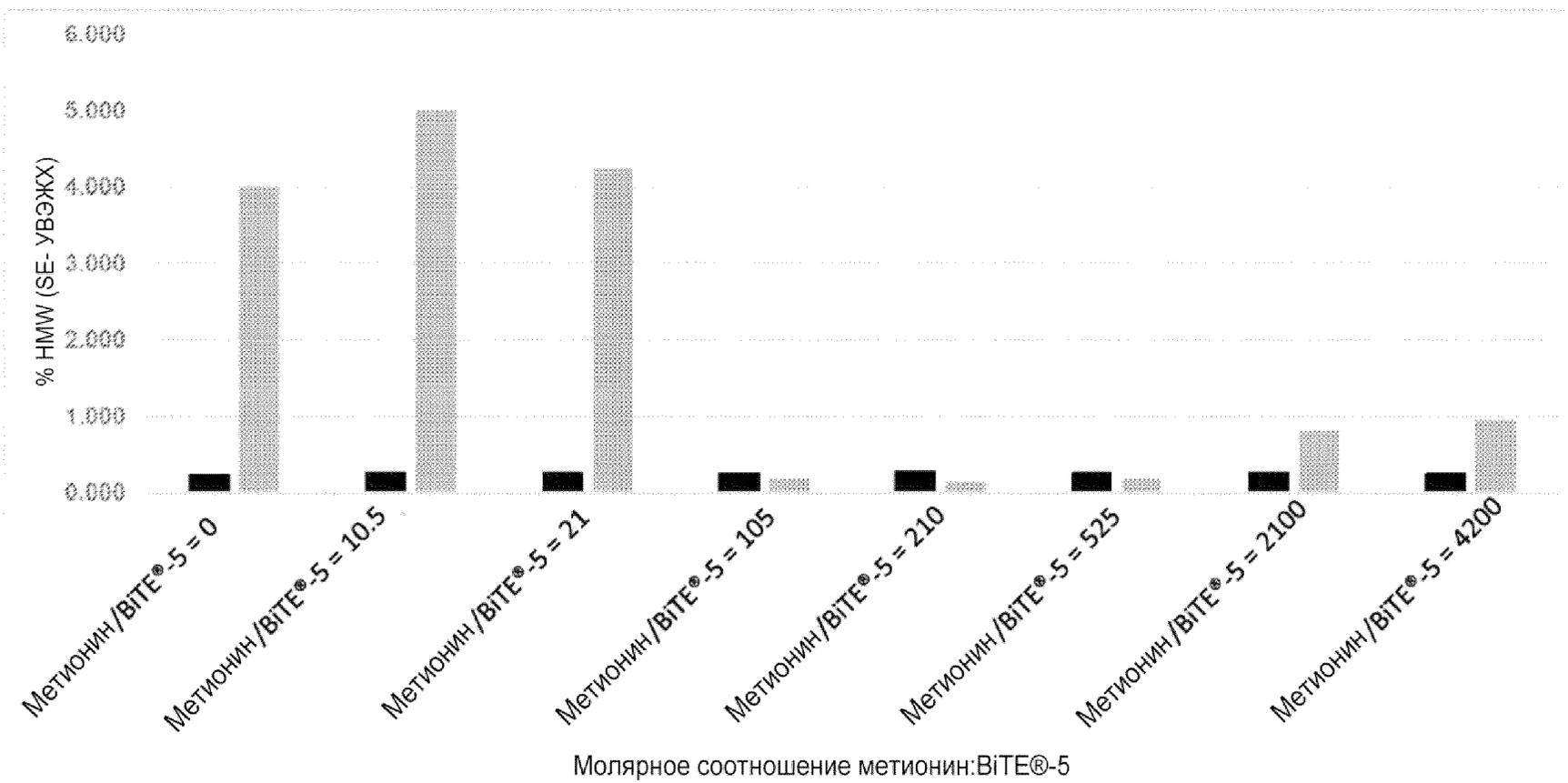
ФИГУРА 6А



ФИГУРА 6В



ФИГУРА 6С



ФИГУРА 7