(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119384432 A
(43)申请公布日 2025.01.28

(21)申请号 202380033671.5

(22)申请日 2023.04.13

(30)优先权数据
63/330,759 2022.04.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/065726 2023.04.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/201299 EN 2023.10.19

(71)申请人 基因泰克公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

(72)发明人 J·吉 E·D·美克斯 S·K·K·拉武里 K·勋哈默 J·Y·泰勒 I·E·沃尔拉斯 A·C·巴尔加瓦 J·J-P·杜博夫 L·J·法斯特 M·普林茨 A·V·奎维特尼布里隆 M·英加廷格

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)

权利要求书13页 说明书137页
序列表（电子公布） 附图33页

(54)发明名称

治疗性蛋白质的药物组合物和使用方法

(57)摘要

本公开提供了治疗性蛋白质的药物组合物及其使用方法。

CN 119384432 A

1.一种药物组合物,其包含治疗性蛋白质、聚山梨醇酯20(PS20)、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中所述PS20与所述治疗性蛋白质的摩尔比为100或更小,所述PS20的浓度为0.01%至0.12%重量/体积(w/v),所述甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且所述缓冲剂的浓度为5mM至20mM。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质的浓度为约10mg/ml或更小。

3.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质的所述浓度介于约0.1mg/ml至约10mg/ml之间。

4.根据权利要求3所述的药物组合物,其中治疗性的浓度为约3mg/ml或约1mg/ml。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的药物组合物,其中所述PS20与所述治疗性蛋白质的所述摩尔比为45至100。

6.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述PS20与所述治疗性蛋白质的所述摩尔比为约48、约71或约79。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制为药物产品(DP)。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,其中所述甲硫氨酸的所述浓度为约2.5mM至约20mM。

9.根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述甲硫氨酸的所述浓度为约10mM。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的所述浓度为约5mM至约25mM。

11.根据权利要求10所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的所述浓度为约10mM或约20mM。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂为组氨酸、磷酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐、或其组合。

13.根据权利要求12所述的药物组合物,其中所述缓冲剂为组氨酸。

14.根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述组氨酸为组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl。

15.根据权利要求10至14中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂为约10mM或约20mM的浓度的组氨酸乙酸盐。

16.根据权利要求10至14中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂为约20mM的浓度的组氨酸HCl。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的药物组合物,其进一步包含张度剂。

18.根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述张度剂为糖、氨基酸或盐。

19.根据权利要求18所述的药物组合物,其中所述张度剂为糖。

20.根据权利要求19所述的药物组合物,其中所述糖为蔗糖、葡萄糖、甘油或海藻糖。

21.根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述糖为蔗糖。

22.根据权利要求17至21中任一项所述的药物组合物,其中所述张度剂的浓度为约100mM至约500mM。

23.根据权利要求22所述的药物组合物,其中所述张度剂的所述浓度为约200mM至约

300mM。

24.根据权利要求23所述的药物组合物,其中所述张度剂的所述浓度为约240mM。

25.根据权利要求1至24中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有约4.5至约8的pH。

26.根据权利要求25所述的药物组合物,其中所述药物组合物的所述pH为约5.1至约6.1。

27.根据权利要求26所述的药物组合物,其中所述药物组合物的所述pH为约5.5或约5.8。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物进一步包含抗氧化剂。

29.根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述抗氧化剂为N-乙酰基-DL-色氨酸。

30.根据权利要求29所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度介于0.1mM与0.5mM之间。

31.根据权利要求30所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为约0.3mM。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质为抗体。

33.根据权利要求32所述的药物组合物,其中所述抗体为双特异性抗体。

34.根据权利要求33所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体包含至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域和至少一个与靶抗原特异性结合的抗原结合结构域。

35.根据权利要求34所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体在Fc区的位置257(EU编号)处具有甲硫氨酸,并且其中,在40℃历经两周,所述Fc区的位置257处的所述甲硫氨酸的氧化小于约10%。

36.根据权利要求35所述的药物组合物,其中,在40℃历经两周,所述Fc区的位置257处的甲硫氨酸的所述氧化不超过约6%。

37.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、表面活性剂、甲硫氨酸和载体,其中所述药物组合物具有约5.5或5.8的pH,并且其中:

(i)所述双特异性抗体包含至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域和至少一个与靶抗原特异性结合的抗原结合结构域,并且其中所述双特异性抗体的浓度为约10mg/ml或更小,

(ii)所述表面活性剂的浓度为约0.05%至约0.12%w/v,并且

(iii)所述甲硫氨酸的浓度为约10mM。

38.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述表面活性剂与所述双特异性抗体的摩尔比为100或更小。

39.根据权利要求37或38所述的药物组合物,其中所述表面活性剂为PS20或泊洛沙姆188(P188)。

40.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述表面活性剂为PS20并且所述PS20的浓度为约0.05%、0.06%或约0.12%w/v。

41.根据权利要求40所述的药物组合物,其中所述PS20与所述双特异性抗体的摩尔比为约45至约100。

42.根据权利要求41所述的药物组合物,其中所述PS20与所述双特异性抗体的摩尔比

为约48、约71或约79。

43.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述表面活性剂为P188并且所述P188的浓度为约0.1%w/v。

44.根据权利要求43所述的药物组合物,其中所述P188与所述双特异性抗体的摩尔比为约5至约25。

45.根据权利要求44所述的药物组合物,其中所述P188与所述双特异性抗体的摩尔比为约17。

46.根据权利要求37至45中任一项所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体的浓度介于约0.1mg/ml至约5mg/ml之间。

47.根据权利要求46所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体的浓度为约1mg/ml或约3mg/ml。

48.根据权利要求37至47中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制为DP。

49.根据权利要求37至48中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物进一步包含约10mM或约20mM的浓度的组氨酸。

50.根据权利要求49所述的药物组合物,其中所述组氨酸为组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl。

51.根据权利要求37至50中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物进一步包含约240mM的浓度的蔗糖。

52.根据权利要求37至51中任一项所述的药物组合物,其中所述载体为水。

53.根据权利要求32至52中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物进一步包含抗氧化剂。

54.根据权利要求53所述的药物组合物,其中所述抗氧化剂为N-乙酰基-DL-色氨酸。

55.根据权利要求54所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度介于0.1mM与0.5mM之间。

56.根据权利要求55所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为约0.3mM。

57.根据权利要求32至56中任一项所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体包含抗CD3臂和抗靶标臂。

58.根据权利要求57所述的药物组合物,其中所述抗靶标臂为抗FcRH5臂。

59.根据权利要求58所述的药物组合物,其中所述抗CD3臂包含CD3结合结构域,所述CD3结合结构域包含:

(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;

(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;

(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;

(iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;

(v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;和

(vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

60.根据权利要求59所述的药物组合物,其中所述CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构

域,其包含与SEQID NO:72的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

61.根据权利要求60所述的药物组合物,其中所述CD3结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列,并且所述CD3结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

62.根据权利要求58至61中任一项所述的药物组合物,其中所述抗FcRH5臂包含FcRH5结合结构域,所述FcRH5结合结构域包含:

(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;

(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;

(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列;

(iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;

(v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;和

(vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

63.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述FcRH5结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQID NO:64的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

64.根据权利要求63所述的药物组合物,其中所述FcRH5结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,并且所述FcRH5结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

65.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、PS20、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中所述PS20与所述双特异性抗体的摩尔比为约100或更小,所述PS20的浓度为约0.01%至约0.12%w/v,所述甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且所述缓冲剂的浓度为5mM至20mM,其中所述双特异性抗体包含抗CD3臂和抗FcRH5臂,并且其中:

(a)所述抗CD3臂包含CD3结合结构域,所述CD3结合结构域包含:

HVR-H1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;

HVR-H2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;

HVR-H3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;

HVR-L1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;

HVR-L2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;和

HVR-L3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列;并且

(b)所述抗FcRH5臂包含FcRH5结合结构域,所述FcRH5结合结构域包含:

HVR-H1,其包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;

HVR-H2,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;

HVR-H3,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列;

HVR-L1,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;

HVR-L2,其包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;和

HVR-L3,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

66.根据权利要求65所述的药物组合物,其中所述CD3结合结构域包含:

(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQID NO:72的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;

并且所述FcRH5结合结构域包含:

(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQID NO:64的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

67.根据权利要求66所述的药物组合物,其中:

(a)所述CD3结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列,并且所述CD3结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列,并且

(b)所述FcRH5结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,并且所述FcRH5结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

68.根据权利要求57所述的药物组合物,其中所述抗靶标臂为抗HER2臂。

69.根据权利要求68所述的药物组合物,其中所述抗CD3臂包含CD3结合结构域,所述CD3结合结构域包含:

(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;

(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;

(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;

(iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;

(v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;和

(vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列。

70.根据权利要求69所述的药物组合物,其中所述CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQID NO:116的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

71.根据权利要求70所述的药物组合物,其中所述CD3结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列,并且所述CD3结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列。

72.根据权利要求68至71中任一项所述的药物组合物,其中所述抗HER2臂包含HER2结合结构域,所述HER2结合结构域包含:

(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;

(iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;

(v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;和

(vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

73.根据权利要求72所述的药物组合物,其中所述HER2结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQID NO:100的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

74.根据权利要求73所述的药物组合物,其中所述HER2结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列,并且所述HER2结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

75.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、PS20、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中所述PS20与所述双特异性抗体的摩尔比为约100或更小,所述PS20的浓度为约0.01%至约0.12%w/v,所述甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且所述缓冲剂的浓度为5mM至20mM,其中所述双特异性抗体包含抗CD3臂和抗HER2臂,并且其中:

(a)所述抗CD3臂包含CD3结合结构域,所述CD3结合结构域包含:

HVR-H1,其包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;

HVR-H2,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;

HVR-H3,其包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;

HVR-L1,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;

HVR-L2,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;和

HVR-L3,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;并且

(b)所述抗HER2臂包含HER2结合结构域,所述HER2结合结构域包含:

HVR-H1,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

HVR-H2,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

HVR-H3,其包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;

HVR-L1,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;

HVR-L2,其包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;和

HVR-L3,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

76.根据权利要求75所述的药物组合物,其中所述CD3结合结构域包含:

(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQID NO:116的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;

并且所述HER2结合结构域包含:

(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQID NO:100的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

77.根据权利要求76所述的药物组合物,其中:

(a)所述CD3结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列,并且所述CD3结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列,并且

(b)所述HER2结合结构域的所述VH结构域包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列并且所述HER2结合结构域的所述VL结构域包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

78.根据权利要求32所述的药物组合物,其中所述抗体为IgG抗体,或者根据权利要求33、34和57至77中任一项所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体为IgG抗体。

79.根据权利要求78所述的药物组合物,其中所述IgG抗体为IgG_1抗体。

80.根据权利要求78或79所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体包含在Fc区中的

一个或多个取代突变。

81.根据权利要求80所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体包含去糖基化位点突变。

82.根据权利要求81所述的药物组合物,其中所述去糖基化位点突变为取代突变。

83.根据权利要求80所述的药物组合物,其中所述一个或多个取代突变降低所述双特异性抗体的效应子功能。

84.根据权利要求80所述的药物组合物,其中所述一个或多个取代突变在选自由N297、L234、L235、D265和P329(EU编号)组成的组的一个或多个氨基酸残基处。

85.根据权利要求84所述的药物组合物,其中所述取代突变为选自由N297A、N297G、L234A、L235A、D265A和P329G(EU编号)组成的组的至少一者。

86.根据权利要求80所述的药物组合物,其中所述Fc区中的所述一个或多个取代突变包含一个或多个杵臼突变。

87.根据权利要求78至86中任一项所述的药物组合物,其中所述抗靶标臂包含T366W和N297G取代突变,并且所述抗CD3臂包含T366S、L368A、Y407V和N297G取代突变。

88.根据权利要求58至67和78至87中任一项所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体为西沃司他单抗。

89.根据权利要求68至87中任一项所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体为芦莫妥单抗。

90.根据权利要求32至89中任一项所述的药物组合物,其中所述至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域与人CD3多肽或食蟹猴(cyno)CD3多肽结合。

91.根据权利要求90所述的药物组合物,其中所述人CD3多肽或所述cyno CD3多肽分别为人CD3ε多肽或cyno CD3ε多肽。

92.根据权利要求90所述的药物组合物,其中所述人CD3多肽或所述cyno CD3多肽分别为人CD3γ多肽或cyno CD3γ多肽。

93.根据权利要求32至92中任一项所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体是单克隆的。

94.根据权利要求32至93中任一项所述的药物组合物,其中所述双特异性抗体是人的、人源化的或嵌合的。

95.根据权利要求1至94中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物呈单位剂型。

96.根据权利要求95所述的药物组合物,其中所述单位剂型为供稀释的液体制剂。

97.根据权利要求96所述的药物组合物,其中在具有约50ml的体积的容器中供应所述供稀释的液体制剂。

98.根据权利要求96所述的药物组合物,其中在具有约15ml的体积的容器中供应所述供稀释的液体制剂。

99.根据权利要求96所述的药物组合物,其中在具有约2ml的体积的容器中供应所述供稀释的液体制剂。

100.根据权利要求96所述的药物组合物,其中在具有约1ml的体积的容器中供应所述供稀释的液体制剂。

101.根据权利要求96或97所述的药物组合物,其中所述供稀释的液体制剂的体积为约15ml或约30ml。

102.根据权利要求96或98所述的药物组合物,其中所述供稀释的液体制剂的体积为约8ml或约15mL。

103.根据权利要求96或99所述的药物组合物,其中所述供稀释的液体制剂的体积为约0.5ml或约0.9ml。

104.根据权利要求96或100所述的药物组合物,其中所述供稀释的液体制剂的体积为约0.5ml或约0.9ml。

105.根据权利要求96至104中任一项所述的药物组合物,其中所述液体制剂供以包含0.45%或0.9%(w/v)NaCl的生理盐水溶液进行稀释。

106.根据权利要求1至105中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含如通过高精确度液体颗粒计数(HIAC)所检测的每ml不超过1,000个具有≥2μm的直径的颗粒。

107.根据权利要求1至106中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物当在5℃±3℃且避光储存时具有至少36个月的保质期。

108.根据权利要求1至107中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物经历一次或多次冻融循环是稳定的。

109.根据权利要求108所述的药物组合物,其中所述药物组合物经历三次或更多次冻融循环是稳定的。

110.根据权利要求1至109中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物在约25℃稳定约两周或更长时间。

111.根据权利要求110所述的药物组合物,其中所述药物组合物在约25℃稳定约四周或更长时间。

112.根据权利要求1至111中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物在-20℃稳定约48个月或更长时间。

113.根据权利要求108至112中任一项所述的药物组合物,其中稳定性是通过尺寸排阻高效液相色谱(SE-HPLC)来评定的。

114.根据权利要求113所述的药物组合物,其中如果所述药物组合物维持如通过SE-HPLC所测量的变化小于5%的纯度,则确定所述药物组合物是稳定的。

115.根据权利要求108至112中任一项所述的药物组合物,其中稳定性是通过非还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)测定来评定的。

116.根据权利要求115所述的药物组合物,其中如果所述药物组合物维持如通过非还原CE-SDS测定所测量的变化小于5%的纯度,则确定所述药物组合物是稳定的。

117.根据权利要求115或116所述的药物组合物,其中所述非还原CE-SDS测定为微芯片CE-SDS(mCE-SDS)测定。

118.根据权利要求1至117中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的约85%或更高的纯度。

119.根据权利要求118所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的约90%或更高的纯度。

120.根据权利要求119所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有如通过SE-HPLC所

评定的约95％或更高的纯度。

121.根据权利要求118至120中任一项所述的药物组合物,其中如通过SE-HPLC所评定的所述药物组合物的所述纯度在约5℃维持大致相同持续约36个月或更长时间。

122.根据权利要求121所述的药物组合物,其中如通过SE-HPLC所评定的所述药物组合物的所述纯度在约5℃维持大致相同持续约42个月或更长时间。

123.根据权利要求122所述的药物组合物,其中如通过SE-HPLC所评定的所述药物组合物的所述纯度在约5℃维持大致相同持续约64个月或更长时间。

124.根据权利要求1至117中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约75％或更高的纯度。

125.根据权利要求124所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约80％或更高的纯度。

126.根据权利要求125所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约85％或更高的纯度。

127.根据权利要求124至126中任一项所述的药物组合物,其中如通过非还原CE-SDS测定所评定的所述药物组合物的所述纯度在约5℃维持约36个月或更长时间。

128.根据权利要求127所述的药物组合物,其中如通过非还原CE-SDS测定所评定的所述药物组合物的所述纯度在约5℃维持约42个月或更长时间。

129.根据权利要求124至128中任一项所述的药物组合物,其中所述非还原CE-SDS测定为微芯片CE-SDS(mCE-SDS)测定。

130.根据权利要求1至129中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于静脉内施用。

131.根据权利要求1至130中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物不含防腐剂。

132.根据权利要求1至131中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于在以包含0.45％或0.9％NaCl的生理盐水溶液稀释后通过输注来施用。

133.根据权利要求1至132中任一项所述的药物组合物,其用于作为药物使用。

134.根据权利要求1至132中任一项所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于:

(i)治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展;或者

(ii)增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能。

135.根据权利要求1至132中任一项所述的药物组合物,其使用于:

(i)治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展;或者

(ii)增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能。

136.根据权利要求134或135所述的用途或使用的药物组合物,其中所述细胞增殖性疾患为癌症。

137.根据权利要求133至136中任一项所述的用途或使用的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质为被配制为与位于免疫效应细胞上的CD3分子和位于除所述免疫效应细胞之外的靶细胞上的靶分子结合的双特异性抗体。

138.根据权利要求137所述的用途或使用的药物组合物,其中所述双特异性抗体在与

所述CD3分子和与所述靶分子结合后活化所述免疫效应细胞。

139.根据权利要求138所述的用途或使用的药物组合物,其中经活化的免疫效应细胞能够对所述靶细胞发挥细胞毒性作用和/或细胞凋亡作用。

140.根据权利要求1至57、78至87和90至132中任一项所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或者用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:非霍奇金淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴性白血病(CLL)、B细胞淋巴瘤、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤之间中间的特征的B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金淋巴瘤之间中间的特征的B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、HHV8相关多中心卡斯尔曼病引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性骨髓性白血病(AML)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、淋巴浆细胞淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特氏淋巴瘤(BL)、B细胞幼淋巴细胞性白血病、脾边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、黏膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。

141.根据权利要求1至57、78至87和90至132中任一项所述的药物组合物,其使用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或者使用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:NHL、CLL、B细胞淋巴瘤、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤之间中间的特征的B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金淋巴瘤之间中间的特征的B细胞淋巴瘤、DLBCL、GCB DLBCL、ABC DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人EBV阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、HHV8相关多中心卡斯尔曼病引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、FL、MCL、AML、MZL、SLL、LL、WM、CNSL、BL、B细胞幼淋巴细胞性白血病、脾边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、MALT淋巴瘤、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。

142.根据权利要求140或141所述的用途或使用的药物组合物,其中所述癌症为GCB DLBCL、ABC DLBCL、FL、MCL、AML、CLL、MZL、SLL、LL、WM、CNSL或BL。

143.根据权利要求1至57、68至87和89至132中任一项所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或者用于增强患有细胞增殖性

疾患的受试者的免疫功能,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤(MM)、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。

144.根据权利要求1至57、68至87和89至132中任一项所述的药物组合物,其使用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或者使用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。

145.根据权利要求143或144所述的用途或使用的药物组合物,其中所述癌症为HER2阳性癌症。

146.根据权利要求1至67、78至88和90至132中任一项所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或者用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:MM、CLL、MCL、DLBCL、FL、AML、骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病、急性早幼粒细胞性白血病(APL)、慢性骨髓增殖性疾患、血小板性白血病、前体B细胞急性淋巴母细胞白血病(pre-B-ALL)、前体T细胞急性淋巴母细胞白血病(pre-T-ALL)、肥大细胞病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、髓系肉瘤、淋巴性白血病和未分化白血病。

147.根据权利要求1至67、78至88和90至132中任一项所述的药物组合物,其使用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或者使用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:MM、CLL、MCL、DLBCL、FL、AML、MDS、CML、慢性粒单核细胞白血病、APL、慢性骨髓增殖性疾患、血小板性白血病、pre-B-ALL、pre-T-

ALL、肥大细胞病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、髓系肉瘤、淋巴性白血病和未分化白血病。

148.根据权利要求146或147所述的用途或使用的药物组合物,其中所述癌症为FcRH5阳性癌症。

149.根据权利要求134至148中任一项所述的用途或使用的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质为被配制用于以约10μg至约100mg的剂量向所述受试者施用的双特异性抗体。

150.根据权利要求149所述的用途或使用的药物组合物,其中所述治疗性蛋白质为被配制用于以约1mg至约60mg的剂量向所述受试者施用的双特异性抗体。

151.根据权利要求134至150中任一项所述的用途或使用的药物组合物,其中待将至少一种额外治疗剂共同施用于所述受试者。

152.根据权利要求134至151中任一项所述的用途或使用的药物组合物,其中所述受试者为人。

153.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至132中任一项所述的药物组合物。

154.一种增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至132中任一项所述的药物组合物。

155.根据权利要求153或154所述的方法,其中所述细胞增殖性疾患为癌症。

156.根据权利要求153至155中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质为被配制为与位于免疫效应细胞上的CD3分子和位于除所述免疫效应细胞之外的靶细胞上的靶分子结合的双特异性抗体。

157.根据权利要求156所述的方法,其中所述双特异性抗体在与所述CD3分子和与所述靶分子结合后活化所述免疫效应细胞。

158.根据权利要求157所述的方法,其中经活化的免疫效应细胞能够对所述靶细胞发挥细胞毒性作用和/或细胞凋亡作用。

159.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展或者增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至57、78至87和90至132中任一项所述的药物组合物,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:NHL、CLL、B细胞淋巴瘤、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤之间中间的特征的B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金淋巴瘤之间中间的特征的B细胞淋巴瘤、DLBCL、GCB DLBCL、ABC DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人EBV阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、HHV8相关多中心卡斯尔曼病引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、FL、MCL、AML、MZL、SLL、LL、WM、CNSL、BL、B细胞幼淋巴细胞性白血病、脾边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、MALT淋巴瘤、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。

160.根据权利要求159所述的方法,其中所述癌症为GCB DLBCL、ABC DLBCL、FL、MCL、AML、CLL、MZL、SLL、LL、WM、CNSL或BL。

161.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展或者增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至57、68至87和89至132中任一项所述的药物组合物,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。

162.根据权利要求161所述的方法,其中所述癌症为HER2阳性癌症。

163.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展或者增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至67、78至88和90至132中任一项所述的药物组合物,其中所述细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:MM、CLL、MCL、DLBCL、FL、AML、MDS、CML、慢性粒单核细胞白血病、APL、慢性骨髓增殖性疾患、血小板性白血病、pre-B-ALL、pre-T-ALL、肥大细胞病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、髓系肉瘤、淋巴性白血病和未分化白血病。

164.根据权利要求163所述的方法,其中所述癌症为FcRH5阳性癌症。

165.根据权利要求153至164中任一项所述的方法,其中所述治疗性蛋白质为双特异性抗体并且是以约10μg至约100mg的剂量向所述受试者施用的。

166.根据权利要求165所述的方法,其中以约1mg至约60mg的剂量向所述受试者施用所述治疗性蛋白质。

167.根据权利要求153至166中任一项所述的方法,其中将至少一种额外治疗剂共同施用于所述受试者。

168.根据权利要求153至167中任一项所述的方法,其中所述受试者为人。

治疗性蛋白质的药物组合物和使用方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有序列表,该序列表已经以XML格式以电子方式提交并且以全文引用的方式并入本文中。所述XML副本创建于2023年3月22日,命名为50474-276WO2_Sequence_Listing_3_22_23,并且大小为119,559个字节。

技术领域

[0003] 本公开涉及包含治疗性蛋白质(例如,T细胞依赖性双特异性抗体或T细胞接合双特异性抗体)的组合物(例如,药物组合物)及其使用方法。

背景技术

[0004] 治疗性蛋白质,诸如抗体(例如,双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)或T细胞接合双特异性抗体(TCB);例如,抗CD20/抗CD3、抗FcRH5/抗CD3或抗HER2/抗CD3 TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗(mosunetuzumab)、格菲妥单抗(glofitamab)、西沃司他单抗(cevostamab)或芦莫妥单抗(runimotamab))正越来越多地用于治疗各种疾病和疾患,诸如癌症和自身免疫。此类治疗性蛋白质可配制在水性载体中以用于向受试者施用,例如通过静脉内或皮下施用。在此类药物组合物储存、处理和施用期间,有必要减少治疗性蛋白质的损失,该损失可通过降解和表面吸附(诸如蛋白质吸附至过滤器、储存罐、管、注射器、静脉内输液袋和其他容器的表面)发生。在其中药物组合物含有相对低浓度的治疗性蛋白质的情况下,这些因素可能显著增加蛋白质损失,导致药物组合物的治疗功效降低。

[0005] 因此,本领域需要开发其中治疗性蛋白质(例如,低剂量治疗性蛋白质)保持稳定并避免因吸附而产生损失的药物制剂。

发明内容

[0006] 本公开涉及包含治疗性蛋白质(例如,低浓度治疗性蛋白质,诸如双特异性抗体(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,抗CD20/抗CD3、抗FcRH5/抗CD3或抗HER2/抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)或T细胞接合双特异性抗体(TCB);例如,抗CD20/抗CD3、抗FcRH5/抗CD3或抗HER2/抗CD3 TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗))的组合物(例如,药物组合物)及其使用方法。所公开的组合物和相关方法解决了递送以低浓度配制的治疗性蛋白质的问题,确保患者接受预期剂量的治疗性蛋白质,而在储存和施用期间几乎无蛋白质损失。

[0007] 在一方面,本公开提供一种药物组合物,该药物组合物包括治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)或T细胞接合双特异性抗体(TCB);例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)、表面活性剂(例如,聚山梨醇酯20(PS20)或泊洛沙姆188(P188))、甲硫氨酸、缓冲剂和载体。在一些实施例中,表面活性剂(例如,PS20或P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为100或更小,例如,90或更小、80或更小、70或更小、60或更小、50或更小、40或更小、30

或更小、20或更小、10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小、2或更小、或1或更小，例如，0.5至100、0.5至50、0.5至10、0.5至5、0.5至1、1至5、2至4、5至100、10至70、10至50、10至30、50至100、60至80、70至80、或40至50。在某些实施例中，表面活性剂(例如，PS20或P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为1至100。在一些实施例中，表面活性剂(例如，PS20)与治疗性蛋白质的摩尔比为45至100、45至55、50至100、60至90、70至90、60至80、70至80、65至75、或75至85，例如，约45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80。在特定实施例中，表面活性剂与治疗性蛋白质的摩尔比为约71。在另一特定实施例中，表面活性剂与治疗性蛋白质的摩尔比为约79。在又一特定实施例中，表面活性剂与治疗性蛋白质的摩尔比为约48。在其他实施例中，表面活性剂(例如，P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为5至50、5至25、10至15、或15至20，例如，约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在特定实施例中，表面活性剂(例如，P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为约14。在另一特定实施例中，表面活性剂(例如，P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为约11.5。

[0008] 在一些实施例中，表面活性剂(例如，PS20或P188)的浓度为0.01％至0.12％重量/体积(weight-by-volume，w/v)(例如，0.01％至0.025％、0.025％至0.5％、0.05％至0.075％、或0.075％至0.12％(w/v)，例如，0.01％至0.02％、0.02％至0.03％、0.03％至0.04％、0.04％至0.05％、0.05％至0.06％、0.06％至0.07％、0.07％至0.08％、0.08％至0.09％、或0.09％至0.12％(w/v)；例如，约0.01％、约0.015％、约0.02％、约0.025％、约0.03％、约0.035％、约0.04％、约0.045％、约0.05％、约0.055％、约0.06％、约0.065％、约0.07％、约0.075％、约0.08％、约0.085％、约0.09％、约0.095％、或约0.1％、约0.115％或约0.12％(w/v))。

[0009] 在一些实施例中，甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM(例如，1mM至10mM、10mM至20mM、20mM至30mM、30mM至40mM或40mM至50mM，例如，约5mM至45mM、10mM至40mM、15mM至35mM、或20mM至30mM，例如，约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM、约20mM、约21mM、约22mM、约23mM、约24mM、约25mM、约26mM、约27mM、约28mM、约29mM、约30mM、约31mM、约32mM、约33mM、约34mM、约35mM、约36mM、约37mM、约38mM、约39mM、约40mM、约41mM、约42mM、约43mM、约44mM、约45mM、约46mM、约47mM、约48mM、约49mM或约50mM)。在一些实施例中，甲硫氨酸的浓度为约10mM。

[0010] 在一些实施例中，缓冲剂的浓度为5mM至20mM(例如，5mM至10mM、10mM至15mM或15mM至20mM，例如，约6mM至18mM、7mM至16mM、8mM至15mM、或9mM至12mM，例如，约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM或约20mM)。

[0011] 在一些实施例中，治疗性蛋白质(例如，抗体；例如，双特异性抗体；例如，抗CD3双特异性抗体；例如，T细胞依赖性双特异性抗体或T细胞接合双特异性抗体；例如，莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度为10mg/ml或更小(例如，9mg/ml或更小、8mg/ml或更小、7.5mg/ml或更小、7mg/ml或更小、6mg/ml或更小、5mg/ml或更小、4mg/ml或更小、3mg/ml或更小、2.5mg/ml或更小、2mg/ml或更小、1.5mg/ml或更小、1.0mg/ml或更小、0.5mg/ml或更小、0.25mg/ml或更小、0.2mg/ml或更小、或0.1mg/ml或更小，例如，

0.01mg/ml至0.1mg/ml、0.1mg/ml至1mg/ml、1mg/ml至5mg/ml、或5mg/ml至10mg/ml,例如,约0.1mg/ml、约0.2mg/ml、约0.3mg/ml、约0.4mg/ml、约0.5mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1.0mg/ml、约1.5mg/ml、约2mg/ml、约2.5mg/ml、约3mg/ml,4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml或约10mg/ml)。在特定实施例中,治疗性蛋白质的浓度为约1mg/ml。在另一特定实施例中,治疗性蛋白质的浓度为约3mg/ml。

[0012] 在一些实施例中,药物组合物被配制为药物产品(DP)。在一些实施例中,被配制为DP的药物组合物具有浓度为约1mg/ml的治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体或T细胞接合双特异性抗体;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)和/或表面活性剂(例如,PS20)与治疗性蛋白质的摩尔比为45至100、45至55、50至100、60至90、70至90、60至80、70至80、65至75、或75至85,例如,约45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80。在特定实施例中,表面活性剂与治疗性蛋白质(例如,莫苏尼妥珠单抗或芦莫妥单抗)的摩尔比为约71。在另一特定实施例中,表面活性剂与治疗性蛋白质(例如,格菲妥单抗)的摩尔比为约79。在一些实施例中,表面活性剂与治疗性蛋白质(例如,芦莫妥单抗)的摩尔比为约48。

[0013] 在一些实施例中,缓冲剂为组氨酸、磷酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐或其组合。例如,在一些实施例中,缓冲剂为组氨酸,诸如组氨酸乙酸盐或组氨酸盐酸盐(HCl)。缓冲剂(例如,组氨酸,例如组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl,例如L-组氨酸乙酸盐或L-组氨酸HCl)的浓度可为例如8mM至12mM,例如,约8mM、约9mM、约10mM、约11mM或约12mM。在一些实施例中,缓冲剂(例如,组氨酸,例如组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl,例如L-组氨酸乙酸盐或L-组氨酸HCl)的浓度为约10mM或20mM。在特定实施例中,缓冲剂为浓度为约20mM的组氨酸HCl。在另一特定实施例中,缓冲剂为浓度为约20mM的组氨酸乙酸盐。在又一特定实施例中,缓冲剂为浓度为约10mM的组氨酸乙酸盐。

[0014] 在一些实施例中,药物组合物进一步包括张度剂,诸如糖、氨基酸或盐。在其中张度剂为糖的实施例中,该糖可为例如蔗糖、葡萄糖、甘油或海藻糖。在特定实施例中,糖为蔗糖。在一些实施例中,张度剂(例如,糖,例如蔗糖)的浓度为100mM至500mM(例如,100mM至120mM、120mM至140mM、140mM至160mM、160mM至180mM、180mM至200mM、200mM至220mM、220mM至240mM、240mM至260mM、260mM至280mM、280mM至300mM、300mM至320mM、320mM至340mM、340mM至360mM、360mM至380mM、380mM至400mM、400mM至420mM、420mM至440mM、440mM至460mM、460mM至480mM、480mM至500mM,例如,100mM至400mM、150mM至350mM、或200mM至300mM,例如,约100mM、约150mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约350mM、约400mM、约450mM或约500mM)。在特定实施例中,张度剂(例如,糖,例如蔗糖)的浓度为约240mM。

[0015] 在一些实施例中,药物组合物进一步包括抗氧化剂。在一些实施例中,抗氧化剂为N-乙酰基-DL-色氨酸。在一些实施例中,N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为0.1mM至0.5mM(例如,约0.1mM、约0.15mM、约0.2mM、约0.25mM、约0.3mM、约0.35mM、约0.4mM,约0.45mM或约0.5mM)。在一些实施例中,N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为约0.3mM。

[0016] 在一些实施例中,药物组合物具有4.5至8(例如,4.5至5.0、5.0至5.5、5.5至6.0、6.0至6.5、6.5至7.0、7.0至7.5、或7.5至8.0,例如,约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约

5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9,约6.0、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4、约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9或约8.0)的pH。在一些实施例中,药物组合物的pH为5.1至6.1。在特定实施例中,药物组合物的pH为约5.8。在另一特定实施例中,药物组合物的pH为约5.5。

[0017] 在一些实施例中,治疗性蛋白质为抗体。在一些实施例中,治疗性蛋白质为抗CD3抗体。在一些实施例中,治疗性蛋白质为双特异性抗体。例如,双特异性抗体可为T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)或T细胞接合双特异性抗体(TCB),诸如具有至少一个靶标抗原结合部分和一个CD3结合部分的双特异性抗体。在一些实施例中,双特异性抗体(例如,TDB或TCB)的靶标抗原结合部分可与CD20、FcRH5或HER2结合。在一些实施例中,靶标抗原结合部分为Fab或交叉Fab。在一些实施例中,治疗性蛋白质为莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗

[0018] 在一些实施例中,双特异性抗体(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体;例如,莫苏尼妥珠单抗)在Fc区的位置257(如在EU索引中)处具有甲硫氨酸。在一些实施例中,Fc区的位置257处的甲硫氨酸的氧化在40℃历经两周而小于10%(例如,在40℃历经两周而小于9%、小于8%、小于7%、小于6%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%)。在一些实施例中,Fc区的位置257处的甲硫氨酸的氧化在40℃历经两周而不大于约6%。

[0019] 在另一方面,药物组合物包括双特异性抗体(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,抗CD20/抗CD3、抗FcRH5/抗CD3或抗HER2/抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,抗CD20/抗CD3、抗FcRH5/抗CD3或抗HER2/抗CD3 TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)、表面活性剂(例如,PS20或泊洛沙姆188(P188))、甲硫氨酸和载体,其中药物组合物具有约5.5或5.8的pH。在一些实施例中,双特异性抗体包括至少一个靶标抗原结合部分和一个CD3结合部分,并且浓度为约10mg/ml或更小(例如,9mg/ml或更小、8mg/ml或更小、7.5mg/ml或更小、7mg/ml或更小、6mg/ml或更小、5mg/ml或更小、4mg/ml或更小、3mg/ml或更小、2.5mg/ml或更小、2mg/ml或更小、1.5mg/ml或更小、1.0mg/ml或更小、0.5mg/ml或更小、0.25mg/ml或更小、0.2mg/ml或更小、或0.1mg/ml或更小,例如,0.01mg/ml至0.1mg/ml、0.1mg/ml至1mg/ml、1mg/ml至5mg/ml、或5mg/ml至10mg/ml,例如,约0.1mg/ml、约0.2mg/ml、约0.3mg/ml、约0.4mg/ml、约0.5mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1.0mg/ml、约1.5mg/ml、约2mg/ml、约2.5mg/ml、约3mg/ml、4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml或约10mg/ml)。在一些实施例中,表面活性剂的浓度为约0.05%至0.12%w/v(例如,0.05%至0.075%或0.075%至0.12%w/v,例如,0.05%至0.06%、0.06%至0.07%、0.07%至0.08%、0.08%至0.09%、或0.09%至0.12%w/v,例如,约0.05%、约0.055%、约0.06%、约0.065%、约0.07%、约0.075%、约0.08%、约0.085%、约0.09%、约0.095%或约0.1%w/v),并且甲硫氨酸的浓度为约10mM。

[0020] 在一些实施例中,表面活性剂(例如,PS20或P188)与双特异性抗体(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体或T细胞接合双特异性抗体;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的摩尔比为100或更小,例如,90或更小、80或更小、70或更小、60或更小、50或更小、40或更小、30或更小、20或更小、10或更小、9或更

小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小、2或更小、或1或更小，例如，0.5至100、0.5至50、0.5至10、0.5至5、0.5至1、1至5、2至4、5至100、10至70、10至50、10至30、50至100、60至80、70至80、或40至50。在某些实施例中，表面活性剂(例如，PS20或P188)与双特异性抗体的摩尔比为1至100。在一些实施例中，表面活性剂(例如，PS20)与双特异性抗体的摩尔比为45至100、45至55、50至100、60至90、70至90、60至80、70至80、65至75、或75至85，例如，约45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80。在特定实施例中，表面活性剂与双特异性抗体的摩尔比为约71。在另一特定实施例中，表面活性剂与双特异性抗体的摩尔比为约79。在某个另一特定实施例中，表面活性剂与双特异性抗体的摩尔比为约48。在一些实施例中，表面活性剂为PS20且PS20的浓度为约0.06％(w/v)。

[0021] 在一些实施例中，双特异性抗体(例如，抗CD3双特异性抗体；例如，TDB或TCB；例如，莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度在约0.1mg/ml至约30mg/ml之间，例如，约0.1mg/ml至约10mg/ml之间、约0.1mg/ml至约5mg/ml之间、约0.1mg/ml至约3mg/ml之间、约0.1mg/ml至约2mg/ml之间、约0.1mg/ml至约1.5mg/ml之间、约0.3mg/ml至约2mg/ml之间、约0.5mg/ml至约2mg/ml之间、约0.5mg/ml至约5mg/ml之间、约0.5mg/ml至约2mg/ml之间、约0.6mg/ml至约2mg/ml之间、约0.7mg/ml至约2mg/ml之间、约0.8mg/ml至约2mg/ml之间、约0.9mg/ml至约10mg/ml之间、约0.5mg/ml至约1.4mg/ml之间、约0.5mg/ml至约1.3mg/ml之间、约0.5mg/ml至约1.2mg/ml之间、约0.5mg/ml至约1.1mg/ml之间、约0.5mg/ml至约1.5mg/ml之间、约0.8mg/ml至约1.2mg/ml、1mg/ml至约30mg/ml之间、约2mg/ml至约30mg/ml之间、约3mg/ml至约30mg/ml之间、约4mg/ml至约30mg/ml之间、约5mg/ml至约30mg/ml之间、约6mg/ml至约30mg/ml之间、约7mg/ml至约30mg/ml之间、约8mg/ml至约30mg/ml之间、约9mg/ml至约30mg/ml之间、约10mg/ml至约30mg/ml之间、约11mg/ml至约30mg/ml之间、约12mg/ml至约30mg/ml之间、约13mg/ml至约30mg/ml之间、约14mg/ml至约30mg/ml之间、约15mg/ml至约30mg/ml之间、约20mg/ml至约30mg/ml之间、约25mg/ml至约30mg/ml之间、约1mg/ml至约20mg/ml之间、约2mg/ml至约20mg/ml之间、约3mg/ml至约20mg/ml之间、约4mg/ml至约20mg/ml之间、约5mg/ml至约20mg/ml之间、约6mg/ml至约20mg/ml之间、约7mg/ml至约20mg/ml之间、约8mg/ml至约20mg/ml之间、约9mg/ml至约20mg/ml之间、约10mg/ml至约20mg/ml之间、约11mg/ml至约20mg/ml之间、约12mg/ml至约20mg/ml之间、约13mg/ml至约20mg/ml之间、约14mg/ml至约20mg/ml之间、约15mg/ml至约20mg/ml之间、约1mg/ml至约15mg/ml之间、约2mg/ml至约15mg/ml之间、约3mg/ml至约15mg/ml之间、约4mg/ml至约15mg/ml之间、约5mg/ml至约15mg/ml之间、约6mg/ml至约15mg/ml之间、约7mg/ml至约15mg/ml之间、约8mg/ml至约15mg/ml之间、约9mg/ml至约15mg/ml之间、约10mg/ml至约15mg/ml之间、约11mg/ml至约15mg/ml之间、约12mg/ml至约15mg/ml之间、约12mg/ml至约14mg/ml之间、约13mg/ml至约15mg/ml之间、约13mg/ml至约14mg/ml之间、约14mg/ml至约15mg/ml之间、约1mg/ml至约10mg/ml之间、约2mg/ml至约10mg/ml之间、约3mg/ml至约10mg/ml之间、约4mg/ml至约10mg/ml之间、约5mg/ml至约10mg/ml之间、约6mg/ml至约10mg/ml之间、约7mg/ml至约10mg/ml之间、约8mg/ml至约10mg/ml之间、约9mg/ml至约10mg/ml之间、约1mg/ml至约5mg/ml之间、约1mg/ml至约3mg/ml之间、约1.5mg/ml至约2.5mg/ml之间、约1.8mg/ml至约2.2mg/ml之间、约2mg/ml至约5mg/ml之间、约3mg/ml至约5mg/ml之间、或约

4mg/ml至约5mg/ml之间。在特定实施例中,双特异性抗体的浓度为约1mg/ml。在一些实施例中,双特异性抗体的浓度为约3mg/ml。在一些实施例中,药物组合物被配制为DP。

[0022] 在一些实施例中,表面活性剂为P188且P188的浓度为约0.08%(w/v)。在其他实施例中,表面活性剂(例如,P188)与双特异性抗体的摩尔比为5至50、5至25、10至15、或15至20,例如,约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在特定实施例中,表面活性剂(例如,P188)与双特异性抗体的摩尔比为约14。在另一特定实施例中,表面活性剂(例如,P188)与双特异性抗体的摩尔比为约11.5

[0023] 在一些实施例中,药物组合物进一步包括浓度为约10mM或20mM的组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl和/或浓度为约240mM的蔗糖。

[0024] 在一些实施例中,双特异性抗体(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体)包括抗靶标臂和抗CD3臂。在一些实施例中,双特异性抗体(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体)的抗靶标臂为抗CD20臂、抗FcRH5臂或抗HER2臂。

[0025] 在一些实施例中,抗CD3臂包括CD3结合结构域,该CD3结合结构域包括:高变区(HVR)-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。例如,在其中CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的一些实施例中,双特异性抗体为莫苏尼妥珠单抗。

[0026] 在一些实施例中,抗靶标臂为包含CD20结合结构域的抗CD20臂,该CD20结合结构域包括:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施例中,CD20结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD20结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列且CD20结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。例如,在其中CD20结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列且CD20结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的一些实施例

中,双特异性抗体为莫苏尼妥珠单抗。

[0027] 在另一方面,本公开的特征在于包含双特异性抗体、PS20和载体的药物组合物,其中PS20与双特异性抗体的摩尔比为100或更小,PS20的浓度为0.01%至0.12%重量/体积(weight-by-volume,w/v),并且双特异性抗体包含抗CD3臂和抗CD20臂,其中抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且抗CD20臂包含CD20结合结构域,该CD20结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。另外地或替代性地,在一些实施例中,CD20结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD20结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列且CD20结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。例如,在药物组合物的一些实施例中,双特异性抗体为莫苏尼妥珠单抗。

[0029] 在一些实施例中,抗CD3臂包括CD3结合结构域,该CD3结合结构域包括:高变区(HVR)-H1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列且CD3结合结

构域的VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。例如,在其中CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的一些实施例中,双特异性抗体为西沃司他单抗。

[0030] 在一些实施例中,抗靶标臂为包含FcRH5结合结构域的抗FcRH5臂,该FcRH5结合结构域包括:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。在一些实施例中,FcRH5结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,FcRH5结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列且FcRH5结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。例如,在其中FcRH5结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列且FcRH5结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的一些实施例中,双特异性抗体为西沃司他单抗。

[0031] 在另一方面,本公开的特征在于包含双特异性抗体、PS20和载体的药物组合物,其中PS20与双特异性抗体的摩尔比为100或更小,PS20的浓度为0.01%至0.12%重量/体积(weight-by-volume,w/v),并且双特异性抗体包含抗CD3臂和抗FcRH5臂,其中抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列;并且抗FcRH5臂包含FcRH5结合结构域,该FcRH5结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。另外地或替代性地,在一些实施例中,FcRH5结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有

至少95％序列同一性(例如,至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性、至少99％序列同一性或100％序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,FcRH5结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列且FcRH5结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。例如,在药物组合物的一些实施例中,双特异性抗体为西沃司他单抗。

[0033] 在一些实施例中,抗CD3臂包括CD3结合结构域,该CD3结合结构域包括:高变区(HVR)-H1,其包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少95％序列同一性(例如,至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性、至少99％序列同一性或100％序列同一性)的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:116的氨基酸序列具有至少95％序列同一性(例如,至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性、至少99％序列同一性或100％序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列。例如,在其中CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的一些实施例中,双特异性抗体为芦莫妥单抗。

[0034] 在一些实施例中,抗靶标臂为包含HER2结合结构域的抗HER2臂,该HER2结合结构域包括:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在一些实施例中,HER2结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少95％序列同一性(例如,至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性、至少99％序列同一性或100％序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少95％序列同一性(例如,至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性、至少99％序列同一性或100％序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,HER2结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列且HER2结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。例如,在其中HER2结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列且HER2结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的一些实施例中,双特异性抗体为芦莫妥单抗。

[0035] 在另一方面,本公开的特征在于包含双特异性抗体、PS20和载体的药物组合物,其中PS20与双特异性抗体的摩尔比为100或更小,PS20的浓度为0.01％至0.12％重量/体积(weight-by-volume,w/v),并且双特异性抗体包含抗CD3臂和抗HER2臂,其中抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序

列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;并且抗HER2臂包含HER2结合结构域,该FcRH5结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0036] 在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:116的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列。另外地或替代性地,在一些实施例中,HER2结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,HER2结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列且HER2结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。例如,在药物组合物的一些实施例中,双特异性抗体为芦莫妥单抗。

[0037] 在一些实施例中,双特异性抗体包含去糖基化位点突变,例如,取代突变。在一些实施例中,抗体(例如,双特异性抗体,例如,TDB或TCB)包括Fc区中的一个或多个取代突变。在某些实施例中,该一个或多个取代突变可降低双特异性抗体的效应子功能。

[0038] 在其中治疗性蛋白质为抗体(例如,双特异性抗体,例如,TDB或TCB)的实施例中,抗体可为IgG抗体(例如,IgG_1抗体或IgG_4抗体)。在特定情况下,抗体为双特异性抗体,该双特异性抗体为IgG_1抗体。在一些实施例中,该一个或多个取代突变在选自由以下项组成的组的一个或多个氨基酸残基处:N297、L234、L235、D265和/或P329(EU编号)。在一些实施例中,Fc区中的一个或多个取代突变包含一个或多个杵臼(knob-in-hole)突变。在一些实施例中,抗靶标臂(例如,抗CD20臂、抗FcRH5臂或抗HER2臂)包括T366W和N297G取代突变,并且抗CD3臂包括T366S、L368A、Y407V和N297G取代突变。

[0039] 双特异性抗体的臂中的至少一个可为单克隆的(例如,抗CD3臂可为单克隆的,抗靶标臂可为单克隆的,或抗CD3臂和抗靶标臂均可为单克隆的)。在一些实施例中,双特异性抗体的臂中的至少一个为人的、人源化的或嵌合的(例如,抗CD3臂为人的、人源化的或嵌合的;抗靶标臂为人的、人源化的或嵌合的;或抗CD3臂和抗靶标臂均为人的、人源化的或嵌合的)。

[0040] 在一些实施例中,双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞接合双特异性抗体)包含至少一个与CD20特异性结合的Fab分子,该Fab分子包含以下六个高变区(HVR):(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID

NO:38的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施例中,双特异性抗体包含至少一个与CD20特异性结合的Fab分子,该Fab分子包含:(a)重链可变VH结构域,其包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少95%(例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%;例如95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少95%(例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%;例如、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施例中,与CD20特异性结合的Fab分子包含:(a)VH结构域,其包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;和(b)VL结构域,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0041] 在一些实施例中,双特异性抗体包含至少一个与CD3特异性结合的Fab分子,该Fab分子包含以下六个HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施例中,双特异性抗体包含至少一个与CD3特异性结合的Fab分子,该Fab分子包含:(a)重链可变VH结构域,其包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少95%(例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%;例如95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少95%(例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%;例如、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施例中,与CD3特异性结合的Fab分子包含:(a)VH结构域,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列;和(b)VL结构域,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0042] 在另一方面,本公开的特征在于包含双特异性抗体、PS20和载体的药物组合物,其中PS20与双特异性抗体的摩尔比为100或更小,PS20的浓度为0.01%至0.12%重量/体积(weight-by-volume,w/v),并且双特异性抗体包含一个特异性结合CD3的Fab分子和两个各自特异性结合CD20的Fab分子,其中与CD3特异性结合的Fab分子包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列;并且两个与CD20特异性结合的Fab各自包含CD20结合结构域,该CD20结合结构域包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0043] 在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构

域,其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。另外地或替代性地,在一些实施例中,每个CD20结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,每个CD20结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列且每个CD20结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。例如,在药物组合物的一些实施例中,双特异性抗体为格菲妥单抗。

[0044] 在一些实施例中,双特异性抗体包含与CD3特异性结合的Fab分子,其中(a)Fab重链和轻链的可变结构域被交换或(b)Fab重链和轻链的恒定结构域被交换。在一些实施例中,双特异性抗体包含至少一个与CD20特异性结合的Fab分子,其中在Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号),并且位置123处的氨基酸被精氨酸(R)或赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号),并且其中在Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号),并且位置213处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号)。在一些实施例中,双特异性抗体对于CD20是双价的且对于CD3是单价的。在一些实施例中,双特异性抗体包含两个与CD20特异性结合的Fab分子和一个与CD3特异性结合的Fab分子。

[0045] 在一些实施例中,双特异性抗体包含:(a)与CD20特异性结合的第一Fab分子;(b)与CD3特异性结合的第二Fab分子;(c)与CD20特异性结合的第三Fab分子;以及(d)由能够稳定缔合的第一和第二亚基构成的Fc结构域;其中依据(c)的第三Fab分子与依据(a)的第一Fab分子相同;其中在依据(a)的第一Fab分子和依据(c)的第三Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号),并且位置123处的氨基酸被精氨酸(R)或赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号);并且其中在依据(a)的第一Fab分子和依据(c)的第三Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号),并且位置213处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号);并且其中依据(a)的第一Fab分子在Fab重链的C末端处与依据(b)的第二Fab的Fab重链的N末端融合,并且依据(b)的第二Fab分子和依据(c)的第三Fab分子各自在Fab重链的C末端处与依据(d)的Fc结构域的亚基中的一者的N末端融合。

[0046] 在一些实施例中,双特异性抗体为人源化抗体。在一些实施例中,双特异性抗体为嵌合抗体。

[0047] 在一些实施例中,双特异性抗体包含Fc结构域,其中Fc结构域为IgG Fc结构域。在一些实施例中,IgG Fc结构域为IgG1 Fc结构域。在一些实施例中,IgG Fc结构域在氨基酸残基N297(EU编号)处包含导致糖基化不存在的突变。在一些实施例中,氨基酸残基N297处的突变为取代突变。在一些实施例中,氨基酸残基N297处的突变降低Fc区的效应子功能。在

一些实施例中,突变为N297G或N297A突变。在一些实施例中,双特异性抗体在Fc区中包含降低效应子功能的突变。在一些实施例中,突变为取代突变。在一些实施例中,取代突变在氨基酸残基L234、L235、D265和/或P329(EU编号)处。在一些实施例中,突变选自由以下项组成的组:L234A、L235A、D265A和P329G。

[0048] 在一些实施例中,双特异性抗体包含一个或多个重链恒定结构域,其中该一个或多个重链恒定结构域选自:第一CH1($CH1_1$)结构域、第一CH2($CH2_1$)结构域、第一CH3($CH3_1$)结构域、第二CH1($CH1_2$)结构域、第二CH2($CH2_2$)结构域和第二CH3($CH3_2$)结构域。在一些实施例中,该一个或多个重链恒定结构域中的至少一个重链恒定结构域与另一个重链恒定结构域配对。在一些实施例中,$CH3_1$和$CH3_2$结构域各自包含突起或空腔,并且其中$CH3_1$结构域中的突起或空腔可分别定位在$CH3_2$结构域的空腔或突起中。在一些实施例中,$CH3_1$结构域和$CH3_2$结构域在突起与空腔之间的界面处相接。在一些实施例中,$CH2_1$和$CH2_2$结构域各自包含突起或空腔,并且其中$CH2_1$结构域中的突起或空腔可分别定位在$CH2_2$结构域的空腔或突起中。在一些实施例中,$CH2_1$结构域与$CH2_2$结构域在所述突起与空腔之间的界面处相接。

[0049] 在任何前述实施例的一些实施例中,CD3结合结构域与人CD3多肽或食蟹猴(cyno)CD3多肽结合。人CD3多肽或食蟹猴CD3多肽可分别为例如人CD3ε多肽或食蟹猴CD3ε多肽。替代性地,人CD3多肽或食蟹猴CD3多肽可分别为人CD3γ多肽或食蟹猴CD3γ多肽。

[0050] 在一些实施例中,药物组合物呈单位剂型(例如,供输注的液体制剂、供注射的液体制剂或供稀释的液体制剂)。在特定实施例中,药物组合物为供稀释的液体制剂。在特定实施例中,在具有约50ml(例如,约40ml、约45ml、约46ml、约47ml、约48ml、约49ml、约50ml、约51ml、约52ml、约53ml、约54ml、约55ml或约60ml)的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,供稀释的液体制剂的体积在20ml至40ml之间(例如,在20ml至30ml之间、在30ml至40ml之间、在20ml至35ml之间、在25ml至40ml之间、在25ml至35ml之间、或在28ml至32ml之间;例如,约20ml、约25ml、约26ml、约27ml、约28ml、约29ml、约30ml、约31ml、约32ml、约33ml、约34ml、约35ml或约40ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约30ml。在一些实施例中,供稀释的液体制剂的体积在10ml至20ml之间(例如,在10ml至15ml之间、在15ml至20ml之间、在13ml至20ml之间、在10ml至17ml之间、在13ml至17ml之间、或在14ml至16ml之间;例如,约10ml、约11ml、约12ml、约13ml、约14ml、约15ml、约16ml、约17ml、约18ml、约19ml或约20ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约15ml。

[0051] 在另一特定实施例中,在具有约1ml或约2ml(例如,约0.5ml、约0.6ml、约0.7ml、约0.8ml、约0.9ml、约1ml、约1.5ml、约1.6ml、约1.7ml、约1.8ml、约1.9ml、约2ml、约2.1ml、约2.2ml、约2.3ml、约2.4ml、约2.5ml或约3ml)的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,在具有约2.5ml的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,供稀释的液体制剂的体积在0.2ml至2ml之间(例如,在0.2ml至1.5ml之间、在0.5ml至2ml之间、在0.5ml至1ml之间、或在0.8ml至1.2ml之间;例如,约0.2ml、约0.5ml、约0.6ml、约0.7ml、约0.8ml、约0.9ml、约1ml、约1.1ml、约1.2ml、约1.3ml、约1.4ml、约1.5ml或约2ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约0.5ml、约0.9ml或约1ml。

[0052] 在又一特定实施例中,在具有约15ml(例如,约10ml、约11ml、约12ml、约13ml、约14ml、约15ml、约16ml、约17ml、约18ml、约19ml或约20ml)的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,在具有约10ml的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实

施例中,供稀释的液体制剂的体积在4ml至12ml之间(例如,在4ml至8ml之间、在8ml至12ml之间、在4ml至10ml之间、在6ml至12ml之间、在6ml至10ml之间、或在7ml至9ml之间;例如,约4ml、约5ml、约6ml、约7ml、约8ml、约9ml、约10ml、约11ml或约12ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约8ml。

[0053] 在一些实施例中,液体制剂用于用稀释剂稀释。在一些实施例中,液体制剂用于用盐水溶液稀释。在一些实施例中,液体制剂用于用生理盐水溶液稀释。在一些实施例中,生理盐水溶液包含氯化钠(NaCl)。在一些实施例中,生理盐水溶液包含在0.1%至1.5%之间(例如,在0.1%至1.2%之间、在0.3%至1.5%之间、在0.4%至0.5%之间、在0.3%至1%之间、在0.8%至1%之间、在0.85%至0.95%之间;例如,约0.1%、约0.3%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.85%、约0.9%、约0.95%、约1%或约1.2%)(w/v)的NaCl)。在一些实施例中,液体制剂(例如,包含抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;例如,抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)未被稀释。

[0054] 在一些实施例中,药物组合物在容器(例如,不锈钢容器或镍钢合金容器(例如,HASTELLOY®)诸如桶(例如,微型桶)或罐(例如,微型罐)或玻璃容器(例如,玻璃小瓶或玻璃安瓿)中。

[0055] 在一些实施例中,药物组合物包含每ml不超过1,000个具有≥2μm的直径的颗粒(例如,每ml 900个或更少、800个或更少、700个或更少、600个或更少、500个或更少、400个或更少、300个或更少、200个或更少、或100个或更少具有≥2μm的直径的颗粒,例如0至100个、100至200个、200至300个、300至400个、400至500个、500至600个、600至700个、700至800个、800至900个、或900至1,000个具有≥2μm的直径的颗粒)。在一些实施例中,载体为水。

[0056] 在一些实施例中,药物组合物当在5℃±3℃且避光储存时具有至少36个月(例如,至少38个月、至少40个月、至少42个月、至少44个月、至少46个月、至少48个月、至少60个月、至少72个月或至少96个月)的保质期。在一些实施例中,药物组合物通过一个或多个冻融循环(例如,两个或更多个冻融循环、三个或更多个冻融循环、四个或更多个冻融循环、五个或更多个冻融循环、六个或更多个冻融循环、八个或更多个冻融循环、或更多)为稳定的。在特定实施例中,药物组合物通过三个或更多个冻融循环为稳定的。在一些实施例中,药物组合物在约25℃稳定达约两周或更久(例如,在约25℃稳定达约三周、约四周、约六周、约八周、约10周、约12周、约24周或更久)。在特定实施例中,该药物组合物在约25℃稳定达约四周或更久。在一些实施例中,药物组合物在-20℃稳定达约48个月或更久(例如,在-20℃稳定达约48个月、约60个月、约72个月、约84个月、约96个月或更久)。

[0057] 在上文或本文所述的任何方面和实施例中的一些实施例中,药物组合物具有约85%或更高的纯度,例如,如通过尺寸排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)所评定。在一些实施例中,纯度为约86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高,例如,85%至90%、90%至95%、或95%至100%,例如,如通过SE-HPLC所评定。在特定实施例中,药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的约90%或更高的纯度或如通过SE-HPLC所评定的约95%或更高的纯度。在一些实施例中,药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约36个月或更久的约95%或更高的纯度(例如,如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约36个月或更久的86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更

高、90％或更高、91％或更高、92％或更高、93％或更高、94％或更高、95％或更高、96％或更高、97％或更高、98％或更高、99％或更高的纯度，例如，如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约36个月或更久的85％至90％、90％至95％、或95％至100％的纯度)。在特定实施例中，药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约42个月或更久(例如，在约5℃持续约42个月、约60个月、约72个月、约84个月、约96个月或更久)的约95％或更高的纯度。

[0058] 在任何前述方面和实施例中，药物组合物具有如通过非还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)测定所评定的约75％或更高的纯度(例如，如通过非还原CE-SDS测定所评定的约76％或更高、约77％或更高、约78％或更高、约79％或更高、约80％或更高、约81％或更高、约82％或更高、约83％或更高、约84％或更高、85％或更高、约86％或更高、约87％或更高、约88％或更高、约89％或更高、约90％或更高、约91％或更高、约92％或更高、约93％或更高、约94％或更高、约95％或更高、约96％或更高、约97％或更高、约98％或更高、约99％或更高的纯度，例如，如通过非还原CE-SDS测定所评定的75％至80％、80％至85％、85％至90％、90％至95％、或95％至100％的纯度)。在特定实施例中，药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约80％或更高的纯度。例如，在一些实施例中，药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约85％或更高的纯度。在一些实施例中，药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约36个月或更久的约85％或更高的纯度(例如，如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约36个月或更久的85％或更高、约86％或更高、约87％或更高、约88％或更高、约89％或更高、约90％或更高、约91％或更高、约92％或更高、约93％或更高、约94％或更高、约95％或更高、约96％或更高、约97％或更高、约98％或更高、约99％或更高的纯度，例如，如通过非还原CE-SDS测定所评定的85％至90％、90％至95％、或95％至100％的纯度)。在一些实施例中，药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约42个月或更久的约85％或更高的纯度(例如，如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约42个月或更久的85％或更高、约86％或更高、约87％或更高、约88％或更高、约89％或更高、约90％或更高、约91％或更高、约92％或更高、约93％或更高、约94％或更高、约95％或更高、约96％或更高、约97％或更高、约98％或更高、约99％或更高的纯度，例如，如通过非还原CE-SDS测定所评定的85％至90％、90％至95％、或95％至100％的纯度)。在一些实施例中，非还原CE-SDS测定为微芯片CE-SDS(mCE-SDS)测定。

[0059] 在一些实施例中，具有上文所述的以上任何保质期、纯度或稳定性特性的药物组合物为DS。在其他实施例中，具有上文所述的任何保质期、纯度或稳定性特性的药物组合物为DP。在一些实施例中，具有上文所述的任何保质期或稳定性特性的药物组合物是冷冻的(例如，储存于在-80℃与2℃之间的温度(例如，约-40℃或-20℃)。

[0060] 在任何前述方面和实施例的一些实施例中，药物组合物被配制用于静脉内、皮下、肌内、局部、口服、透皮、腹膜内、眶内、鼻内、鞘内或心室内施用。例如，在特定实施例中，药物组合物被配制用于静脉内施用。在其他实施例中，药物组合物被配制用于皮下施用。在一些实施例中，药物组合物不含有防腐剂。在一些实施例中，药物组合物(例如，包含抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体；例如，抗FcRH5/抗CD3 TDB；例如，西沃司他单抗)被配制用于在不稀释的情况下通过输注施用。在一些实施例中，药物组合物被配制用于在用盐水或稀释剂(例如，盐水溶液；例如，生理盐水溶液；例如，包含0.45％或0.9％(w/v)NaCl的生理盐水溶液)

稀释之后通过输注施用。在一些实施例中,液体制剂用于用水溶液稀释。在一些实施例中,液体制剂用于用盐水溶液稀释。在一些实施例中,液体制剂用于用生理盐水溶液稀释。在一些实施例中,生理盐水溶液包含氯化钠(NaCl)。在一些实施例中,生理盐水溶液包含在0.1%至1.5%之间(例如,在0.1%至1.2%之间、在0.3%至1.5%之间、在0.4%至0.5%之间、在0.3%至1%之间、在0.8%至1%之间、在0.85%至0.95%之间;例如,约0.1%、约0.3%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.85%、约0.9%、约0.95%、约1%或约1.2%)(w/v)的NaCl)。

[0061] 在另一方面,任何前述方面和实施例的药物组合物用为药物。

[0062] 在另一方面,任何前述方面和实施例的药物组合物用于治疗有此需要的受试者(例如,有此需要的人类受试者)的细胞增殖性疾患或延迟其进展。

[0063] 在又一方面,任何前述方面和实施例的药物组合物用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能。

[0064] 在一些实施例中,细胞增殖性疾患为癌症。在一些实施例中,治疗性蛋白质为被配制以与位于免疫效应细胞上的CD3分子和位于除了免疫效应细胞外的靶标细胞上的靶标分子(例如,位于靶标细胞诸如B细胞上(例如,由其表达)的CD20分子)结合的双特异性抗体。在一些实施例中,双特异性抗体在与CD3分子和与靶标分子结合后活化免疫效应细胞。在一些实施例中,活化的免疫效应细胞能够对靶标细胞施加细胞毒性效应和/或细胞凋亡效应。

[0065] 在一些实施例中,例如,其中治疗性蛋白质为具有抗CD20臂的双特异性抗体,细胞增殖性疾患为癌症,该癌症为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在一些实施例中,NHL选自由以下项组成的组:慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞淋巴瘤、脾脏弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特(Burkitt)淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、具有11q畸变的伯基特样淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与经典霍奇金氏淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、活化B细胞样(ABC)DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、HHV8相关多中心卡斯尔曼氏病(Castleman disease)引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、滤泡性淋巴瘤(FL)、原位滤泡性肿瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、原位套细胞瘤、急性髓系白血病(AML)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrommacroglobulinemia,WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma,BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾脏淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞性淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。在特定实施例中,癌症为弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、中枢神经系

统淋巴瘤(CNSL)或伯基特淋巴瘤(BL)。

[0066] 在一些实施例中,癌症选自由以下项组成的组:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。在一些实施例中,癌症为HER2阳性癌症。

[0067] 在一些实施例中,治疗性蛋白质为被配制用于以约10μg至约100mg(例如,100μg至80mg、500μg至50mg、或1mg至20mg,例如,约10μg至50μg、50μg至100μg、100μg至200μg、200μg至500μg、500μg至1mg、1mg至5mg、5mg至10mg、10mg至20mg、20mg至30mg、30mg至40mg、40mg至50mg、50mg至60mg、60mg至70mg、70mg至80mg、80mg至90mg、或90至100mg,例如,约10μg、约20μg、约25μg、约30μg、约40μg、约50μg、约60μg、约70μg、约75μg、约80μg、约90μg、约100μg、约200μg、约250μg、约300μg、约400μg、约500μg、约600μg、约700μg、约750μg、约800μg、约900μg、约1mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约75mg、约80mg、约90mg或约100mg)的剂量向受试者施用的双特异性抗体(例如,TDB或TCB)。在特定实施例中,治疗性蛋白质为被配制用于以约1mg至约60mg的剂量向受试者施用的双特异性抗体。

[0068] 在一些实施例中,药物组合物(例如,包含抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;例如,抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)在不被稀释的情况下向受试者施用(例如,以约1mg/ml或约3ml/ml的浓度)。在一些实施例中,药物组合物在用盐水溶液稀释之后向受试者施用。在一些实施例中,盐水溶液为生理盐水溶液。在一些实施例中,生理盐水溶液包含氯化钠(NaCl)。在一些实施例中,生理盐水溶液包含在0.1%至1.5%之间(例如,在0.1%至1.2%之间、在0.3%至1.5%之间、在0.4%至0.5%之间、在0.3%至1%之间、在0.8%至1%之间、在0.85%至0.95%之间;例如,约0.1%、约0.3%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.85%、约0.9%、约0.95%、约1%或约1.2%)(w/v)的NaCl)。在特定实施例中,生理盐水溶液包含0.45%或0.9%(w/v)NaCl。

[0069] 在一些实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度为约0.001mg/ml至约0.6mg/ml(例如,约0.001mg/ml、约0.002mg/ml、约0.003mg/ml、约0.004mg/ml、约0.005mg/ml、约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.03mg/ml、约0.04mg/ml、约0.05mg/ml、约0.75mg/ml、约0.1mg/ml、约0.11mg/ml、约0.12mg/ml、约0.13mg/ml、约0.14mg/ml、约0.15mg/ml、约0.16mg/ml、约0.17mg/ml、约0.18mg/ml、约0.19mg/ml、约0.2mg/ml、约0.21mg/ml、约0.22mg/ml、约0.23mg/ml、约0.24mg/ml、约0.25mg/ml、约0.26mg/ml、约0.27mg/ml、约0.28mg/ml、约0.29mg/ml、约0.3mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml或约0.6mg/ml)。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度为约0.003mg/ml、约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.03mg/ml、约0.04mg/ml、约0.12mg/ml、约0.24mg/ml或约0.3mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗CD20/抗CD3双特异性抗体;抗CD20/抗CD3 TDB;例如,莫苏尼妥珠单抗)的浓度为约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.04mg/ml、约0.12mg/ml、约0.24mg/ml或

约0.3mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗CD20/抗CD3双特异性抗体;抗CD20/抗CD3 TCB;例如,格菲妥单抗)的浓度为约0.1mg/ml或约0.6mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)的浓度为约0.003mg/ml、0.03mg/ml或0.3mg/ml。

[0070] 在一些实施例中,受试者待被共同施用至少一种另外的治疗剂(例如,一种、两种、三种、四种或更多种另外的治疗剂)。在一些实施例中,该至少一种另外的治疗剂包括PD-1轴结合拮抗剂。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂选自由PD-L1结合拮抗剂、PD-1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂组成的组。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂(例如,阿特珠单抗(MPDL3280A)、MDX-1105(BMS-936559;描述于WO 2016/201425中)和MEDI4736(德瓦鲁单抗(durvalumab)))。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂(例如,MDX-1106(纳武单抗(nivolumab))、MK-3475(派姆单抗(lambrolizumab))、AMG 404、REGN2810(西米普利单抗(cemiplimab);LIBTAYO®)和AMP-224(描述于WO 2017/058780中))。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L2结合拮抗剂(例如,抗体(例如,抗PD-L2抗体)或免疫粘附素)。在一些实施例中,该至少一种另外的治疗剂包括奥妥珠单抗、利妥昔单抗、抗体-药物缀合物(ADC)、皮质类固醇或托珠单抗。在一些实施例中,治疗性蛋白质为包含抗CD3臂和抗CD20臂的双特异性抗体,并且该至少一种另外的治疗剂包含ADC(例如,抗CD79b ADC,例如,维泊妥珠单抗(polatuzumab vedotin))。在一些实施方案中,受试者是人。

[0071] 在另一方面,本公开的特征在于治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展的方法。在一些实施例中,该方法包括向受试者施用有效量的任何前述方面的药物组合物。

[0072] 在另一方面,本公开的特征在于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,例如,通过向受试者施用有效量的任何前述方面的药物组合物。

[0073] 在一些实施例中,细胞增殖性疾患为癌症。在一些实施例中,向受试者施用的药物组合物的治疗性蛋白质为被配制以与位于免疫效应细胞上的CD3分子和位于除了免疫效应细胞外的靶标细胞上的靶标分子(例如,位于靶标细胞诸如B细胞上(例如,由其表达)的CD20分子)结合的双特异性抗体。在一些实施例中,双特异性抗体在与CD3分子和与靶标分子结合后活化免疫效应细胞。在一些实施例中,活化的免疫效应细胞能够对靶标细胞施加细胞毒性效应和/或细胞凋亡效应。

[0074] 在一些实施例中,例如,其中治疗性蛋白质为具有抗CD20臂的双特异性抗体,细胞增殖性疾患为癌症,该癌症为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在一些实施例中,NHL选自由以下项组成的组:慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞淋巴瘤、脾脏弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特(Burkitt)淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、具有11q畸变的伯基特样淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与经典霍奇金氏淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、活化B细胞样(ABC)DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴

瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、HHV8相关多中心卡斯尔曼氏病(Castleman disease)引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、滤泡性淋巴瘤(FL)、原位滤泡性肿瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、原位套细胞瘤、急性髓系白血病(AML)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrommacroglobulinemia,WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma,BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾脏淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞性淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。在特定实施例中,癌症为弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)或伯基特淋巴瘤(BL)。

[0075] 在一些实施例中,癌症选自由以下项组成的组:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。在一些实施例中,癌症为HER2阳性癌症。

[0076] 在一些实施例中,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体)以约10μg至约100mg(例如,100μg至80mg、500μg至50mg、或1mg至20mg,例如,10μg至50μg、50μg至100μg、100μg至200μg、200μg至500μg、500μg至1mg、1mg至5mg、5mg至10mg、10mg至20mg、20mg至30mg、30mg至40mg、40mg至50mg、50mg至60mg、60mg至70mg、70mg至80mg、80mg至90mg、或90至100mg,例如,约10μg、约20μg、约25μg、约30μg、约40μg、约50μg、约60μg、约70μg、约75μg、约80μg、约90μg、约100μg、约200μg、约250μg、约300μg、约400μg、约500μg、约600μg、约700μg、约750μg、约800μg、约900μg、约1mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约75mg、约80mg、约90mg或约100mg)的剂量向受试者施用。在特定实施例中,该方法包括以约1mg至约60mg的剂量向受试者施用治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体)。

[0077] 在一些实施例中,受试者被共同施用至少一种另外的治疗剂(例如,一种、两种、三种、四种或更多种另外的治疗剂)。在一些实施例中,该至少一种另外的治疗剂包括PD-1轴结合拮抗剂。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂选自由PD-L1结合拮抗剂、PD-1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂组成的组。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂(例如,阿特珠单抗(MPDL3280A)、MDX-1105(BMS-936559)和MEDI4736(德瓦鲁单抗))。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂(例如,MDX-1106(纳武单抗)、MK-3475(派姆单抗)、AMG 404、REGN2810(西米普利单抗;LIBTAYO®)和AMP-224(描述于WO 2017/058780中))。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L2结合拮抗剂(例如,抗体(例如,抗PD-L2抗体)或免疫粘附素)。在一些实施例中,该至少一种另外的治疗剂包括奥妥珠单抗、利妥昔单抗、抗体-药物缀合物(ADC)、皮质类固醇或托珠单抗。在一些实施例中,治疗性蛋白质为包含抗CD3臂和抗CD20臂的双特异性抗体,并且该至少一种另外的治疗剂包含

ADC(例如,抗CD79b ADC,例如,维泊妥珠单抗(polatuzumab vedotin))。在一些实施例中,药物组合物经静脉内、皮下、肌内、局部、口服、透皮、腹膜内、眶内、鼻内、鞘内或经心室内施用。在一些实施方案中,受试者是人。

[0078] 除非上下文另外明确指出,否则可以合并各实施例。除非上下文另外明确指出,否则各实施例可以应用于本公开的各个方面。

[0079] 通过以下针对某些优选实施例和权利要求的更详细描述,本公开的特定实施例将变得显而易见。

附图说明

[0080] 图1为汇总用于各种III期药物产品(DP)制剂的递送和使用考虑的表格。

[0081] 图2为显示作为剂量和DP蛋白质浓度函数的最小PS20浓度(%w/v)的图,如通过100ml PO袋中的IV袋振摇研究所确定。x轴显示以mg/ml为单位的DP蛋白质浓度,而y轴示出以mg为单位的剂量

[0082] 图3为显示各种IV袋尺寸和抗CD20/抗CD3 TDB的量对防止在1mg/ml DP发生聚集和颗粒形成所需的最小表面活性剂(PS20或P188)浓度的影响的图。x轴(从左到右)上每组条件的第一个条表示>5mg的TDB,第二个条表示2mg TDB,且第三个条表示1mg TDB。

[0083] 图4A为显示在40℃用PS20以1mg/ml(三角形)、10mg/ml(正方形)或60mg/ml(菱形)配制的莫苏尼妥珠单抗在甲硫氨酸257(Met257)处的蛋白质氧化动力学的图。

[0084] 图4B为显示在40℃用P188以1mg/ml(三角形)、10mg/ml(正方形)或60mg/ml(菱形)配制的莫苏尼妥珠单抗在甲硫氨酸257处的蛋白质氧化动力学的图。

[0085] 图4C为显示在40℃用srPS20以1mg/ml(三角形)、10mg/ml(正方形)或60mg/ml(菱形)配制的莫苏尼妥珠单抗在甲硫氨酸257处的蛋白质氧化动力学的图。

[0086] 图5为显示在40℃用30mM组氨酸(菱形)或10mM组氨酸(正方形)配制的莫苏尼妥珠单抗在甲硫氨酸257处的蛋白质氧化动力学的图。

[0087] 图6为显示在高达300,000勒克司-小时的环境光暴露之后(在5500勒克司光强度下)各种制剂中的莫苏尼妥珠单抗在甲硫氨酸257处的氧化百分比的图。x轴(从左到右)上每种制剂的第一个条表示时间=0;第二条表示24小时;第三个条表示54小时;且最后一个(第四个)条表示暗处对照。

[0088] 图7A为显示在5℃储存长达12个月的各种莫苏尼妥珠单抗组合物中过氧化氢(H_2O_2)浓度的动力学的图。测试的BTCT4465A组合物包括单独组合物(1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08%(w/v)PS20、160mM蔗糖,pH 5.8;对照,菱形)、组合物+H_2O_2(正方形)、组合物+H_2O_2+2.5mM甲硫氨酸(三角形)、组合物+5mM甲硫氨酸(深色X轴)、组合物+H_2O_2+5mM甲硫氨酸(浅色X轴)和组合物+H_2O_2+10mM甲硫氨酸(浅色X轴)。H_2O_2浓度通过AMPLEX®Red测定测量。

[0089] 图7B为显示在5℃储存长达12个月的各种莫苏尼妥珠单抗组合物中甲硫氨酸257处的氧化动力学的图。测试的莫苏尼妥珠单抗组合物包括单独组合物(1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08%(w/v)PS20、160mM蔗糖,pH 5.8;对照,菱形)、组合物+H_2O_2(正方形)、组合物+H_2O_2+2.5mM甲硫氨酸(三角形)、组合物+5mM甲硫氨酸(深色X轴)、组合物+H_2O_2+5mM甲硫氨酸(浅色X轴)和组合物+H_2O_2+10mM甲硫氨酸(浅色X轴)。氧化通过肽图分析

来测量。

[0090] 图8A为显示在25℃储存长达六个月的各种莫苏尼妥珠单抗组合物中过氧化氢(H_2O_2)浓度的动力学的图。测试的莫苏尼妥珠单抗组合物包括单独组合物(1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08％(w/v)PS20、160mM蔗糖,pH 5.8;对照,菱形)、组合物+H_2O_2(正方形)、组合物+H_2O_2+2.5mM甲硫氨酸(三角形)、组合物+5mM甲硫氨酸(深色X轴)、组合物+H_2O_2+5mM甲硫氨酸(浅色X轴)和组合物+H_2O_2+10mM甲硫氨酸(浅色X轴)。H_2O_2浓度通过AMPLEX®Red测定测量。

[0091] 图8B为显示在25℃储存长达六个月的各种莫苏尼妥珠单抗组合物的CD20臂中色氨酸107处的氧化动力学的图。测试的莫苏尼妥珠单抗组合物包括单独组合物(1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08％(w/v)PS20、160mM蔗糖,pH 5.8;对照,菱形)、组合物+H_2O_2(正方形)、组合物+H_2O_2+2.5mM甲硫氨酸(三角形)、组合物+5mM甲硫氨酸(深色X轴)、组合物+H_2O_2+5mM甲硫氨酸(浅色X轴)和组合物+H_2O_2+10mM甲硫氨酸(浅色X轴)。氧化通过肽图分析来测量。

[0092] 图8C为显示在25℃储存长达六个月的各种莫苏尼妥珠单抗组合物的甲硫氨酸257处的氧化动力学的图。测试的莫苏尼妥珠单抗组合物包括单独组合物(1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08％(w/v)PS20、160mM蔗糖,pH 5.8;对照,菱形)、组合物+H_2O_2(正方形)、组合物+H_2O_2+2.5mM甲硫氨酸(三角形)、组合物+5mM甲硫氨酸(深色X轴)、组合物+H_2O_2+5mM甲硫氨酸(浅色X轴)和组合物+H_2O_2+10mM甲硫氨酸(浅色X轴)。氧化通过肽图分析来测量。

[0093] 图8D为显示在25℃储存长达六个月的各种莫苏尼妥珠单抗组合物中通过SEC所测量的高分子量物质(HMWS)水平的动力学的图。测试的莫苏尼妥珠单抗组合物包括单独组合物(1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08％(w/v)PS20、160mM蔗糖,pH 5.8;对照,菱形)、组合物+H_2O_2(正方形)、组合物+H_2O_2+2.5mM甲硫氨酸(三角形)、组合物+5mM甲硫氨酸(深色X轴)、组合物+H_2O_2+5mM甲硫氨酸(浅色X轴)和组合物+H_2O_2+10mM甲硫氨酸(浅色X轴)。

[0094] 图8E为显示在25℃储存长达六个月的各种莫苏尼妥珠单抗组合物中通过mCE-SDS所测量的低分子量物质水平的动力学的图。测试的莫苏尼妥珠单抗组合物包括单独组合物(1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08％(w/v)PS20、160mM蔗糖,pH 5.8;对照,菱形)、组合物+H_2O_2(正方形)、组合物+H_2O_2+2.5mM甲硫氨酸(三角形)、组合物+5mM甲硫氨酸(深色X轴)、组合物+H_2O_2+5mM甲硫氨酸(浅色X轴)和组合物+H_2O_2+10mM甲硫氨酸(浅色X轴)。

[0095] 图9A为显示在40℃和75％相对湿度(RH)下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中通过SE-HPLC所测量的HMWS水平随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0096] 图9B为显示在40℃和75％ RH下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中通过SE-HPLC所测量的单体水平随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0097] 图9C为显示在40℃和75％ RH下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中通过SE-HPLC所测量的LMWS水平随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0098] 图10A为显示在40℃和75％ RH下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中通过icIEF所测量的酸性变体随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0099] 图10B为显示在40℃和75％ RH下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中

通过icIEF所测量的主峰随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0100] 图10C为显示在40℃和75％ RH下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中通过icIEF所测量的碱性变体随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0101] 图11A为显示在40℃和75％ RH下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中通过mCE-SDS所测量的峰前的总和随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0102] 图11B为显示在40℃和75％ RH下储存长达一个月的各种莫苏尼妥珠单抗制剂中通过mCE-SDS所测量的主峰的总和随时间变化的图。制剂F1至F5在表5中表征。

[0103] 图12为显示对莫苏尼妥珠单抗组合物的pH值的道南效应的图。

[0104] 图13:显示格菲妥单抗的结构的示意图。

[0105] 图14:制剂开发GLP Tox和进入人体研究。制剂F1至F5的表面活性剂含量,初始与在5℃、25℃或40℃储存6周之后。

[0106] 图15A至图15C:制剂开发GLP Tox和进入人体研究,制剂F1至F5的尺寸排阻色谱(SEC),初始与在5℃、25℃或40℃储存6周之后。图15A:主峰,图15B:高分子量(HMW);图15C:低分子量(LMW)。

[0107] 图16A至图16C:制剂开发GLP Tox和进入人体研究,制剂F1至F5的离子交换色谱(IEC),初始与在5℃、25℃或40℃储存6周之后。图16A:主峰,图16B:HMW;图16C:LMW

[0108] 图17:制剂开发-制剂F1长达84周的分析结果。F1＝5mg/ml RO7022859(即,格菲妥单抗)、20mM组氨酸HCl pH 5.5、240mM蔗糖、10mM甲硫氨酸、0.05％(w/v)聚山梨醇酯20。

[0109] 图18A:制剂开发GLP Tox和进入人体研究,制剂F1至F5的huCD20结合,初始与在5℃、25℃或40℃储存3周和6周之后。

[0110] 图18B:制剂开发GLP Tox和进入人体研究,制剂F1至F5的huCD3结合,初始与在5℃、25℃或40℃储存3周和6周之后。

[0111] 图19A至图19B:针对III期和商业制剂的开发研究。在5℃储存104周之后,格菲妥单抗尺寸排阻(SE)-HPLC％HMWS(图19A)和离子交换(IE)-HPLC％酸性区(图19B)作为蛋白质浓度的函数。

[0112] 图20A至图20B:针对III期和商业制剂的开发研究。在40℃储存6周之后,格菲妥单抗SE-HPLC％HMWS(图20A)和IE-HPLC％酸性区(图20B)作为pH和稳定剂(甲硫氨酸)添加的函数。

[0113] 图21:针对III期和商业制剂的开发研究。在25℃储存26周之后,格菲妥单抗SE-HPLC％HMWS(包括可见颗粒形成)和IE-HPLC％酸性区作为张度剂的函数。

[0114] 图22:针对III期和商业制剂的开发研究。在25℃振摇7天之后,格菲妥单抗SE-HPLC％HMWS(包括可见颗粒形成)和IE-HPLC％酸性区作为表面活性剂的函数。

[0115] 图23:针对III期和商业制剂的开发研究。初始和在5℃储存104周之后的格菲妥单抗PS20含量[mg/ml]和可见颗粒形成作为蛋白质浓度的函数。

[0116] 图24:长期稳定性数据:稳定性研究(储存在2℃至8℃)中的示例性格菲妥单抗DP批次的PS20含量。

具体实施方式

[0117] I.定义

[0118] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术术语、符号和其他科学术语旨在具有本公开所属领域的技术人员通常理解的含义。在某些情况下,为清晰起见和/或为便于参考,本文定义了具有通常理解含义的术语,并且与现有技术中通常理解的术语定义相比,本文包含的这些定义不一定解释成表示与本领域的通常理解存在明显差异。

[0119] 如本文所用,术语“约”是指为此技术领域中的技术人员容易知晓的相应值的常见误差范围。在本文中提及“约”值或参数包括(并且描述)涉及该值或参数本身的实施例。

[0120] 如本文所用,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”及“该/所述”包括复数个所指对象。例如,提及“一种分离的肽”是指一种或多种分离的肽。

[0121] 在整个说明书和权利要求中,词语“包括”或诸如“包含(comprises或comprising)”的变体应被理解为暗示包括所陈述的整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。

[0122] 术语“药物组合物”和“药物制剂”在本文中可互换使用并且是指这样的一种制备物,该制备物的形式允许该制备物中所含的活性成分的生物活性有效,并且该制备物不含对制剂将施用至的受试者具有不可接受的毒性的附加组分。

[0123] 术语“治疗性蛋白质”是指可向受试者施用以引发与疾病或病理状况的治疗或改善相关联的生物反应的蛋白质。治疗性蛋白质包括生物药物,诸如肽、抗体(例如,双特异性抗体,例如T细胞依赖性双特异性抗体(TDB),例如抗CD20/抗CD3 TDB,例如莫苏尼妥珠单抗,例如T细胞接合双特异性抗体(TCB),例如抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)、免疫缀合物

[0124] “药用载体”或“载体”是指药物制剂中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药用载体或载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0125] 术语“保质期”是指产品(例如,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体,例如TDB,例如抗CD20/抗CD3 TDB,例如莫苏尼妥珠单抗,例如TCB,例如抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗))可以储存而不会变得不适于使用(例如,通过向受试者施用来使用)或销售的时间长度。在一些实施例中,保质期为其中组合物(例如,药物组合物)为稳定的时间长度。例如,在一些实施例中,本文的组合物当在5℃±3℃且避光储存时具有至少36个月的保质期。

[0126] “稳定”药物制剂是其中蛋白质(例如,治疗性蛋白质)在储存时基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的药物制剂。优选地,制剂在储存(例如,冷冻储存)时基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物活性。储存期通常基于制剂的预期有效期进行选择。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术可在本领域获得且综述于例如Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,Pubs.(1991)和Jones,A.Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90(1993)中。可在选定的曝光量和/或温度下测量选定时间段内的稳定性。可以多种不同方式定性和/或定量地评估稳定性,包括评估聚集体形成(例如,使用尺寸排阻色谱、通过测量浊度和/或通过目视检测);评估ROS形成(例如,通过使用光应力测定或2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷)二盐酸盐(AAPH)应力测定);使蛋白质的特定氨基酸残基(例如,抗体的Met残基)氧化;通过使用阳离子交换色谱、图像毛细管等电聚焦(icIEF)或毛细管区带电泳评定电荷异质性;氨基末端或羧基末端序列分析;质谱分析;SDS-PAGE分析以比较还原和完整多肽(例如,治疗性蛋白质);肽图(例如,胰蛋白酶或LYS-C)分析;评估蛋白质的生物活性或靶标结合功能(例如,抗

体与其抗原的结合,例如TDB与T细胞和/或靶标细胞的结合);等。不稳定性可涉及以下中的任意一者或多者:聚集、脱酰胺(例如,Asn脱酰胺)、氧化(例如,Met氧化和/或Trp氧化)、异构化(例如,Asp异构化)、剪切/水解/片段化(例如,铰链区片段化)、琥珀酰亚胺形成、未配对的半胱氨酸、N末端延伸、C末端处理、糖基化差异等。

[0127] 如果药物制剂中的蛋白质(例如,治疗性蛋白质,诸如双特异性抗体)在目视检查颜色和/或清晰度时或在通过UV光散射或通过尺寸排阻色谱测量时不显示或显示极少聚集、沉淀、片段化和/或变性的迹象,则该蛋白质"保留其物理稳定性"。

[0128] 如果药物制剂中的蛋白质(例如,治疗性蛋白质,诸如双特异性抗体)在给定时间的化学稳定性使得该蛋白质(例如,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB))被认为仍保留其如下所定义的生物活性,则该蛋白质"保留其化学稳定性"。化学稳定性可通过检测并对蛋白质(例如,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB,例如抗CD20/抗CD3 TDB或TCB)的化学改变形式进行定量来评定。化学改变可涉及蛋白质氧化,其可使用例如胰蛋白酶肽图、反相高效液相色谱(HPLC)和液相色谱-质谱(LC/MS)进行评估。其他类型的化学改变包括蛋白质(例如,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB,例如抗CD20/抗CD3 TDB或TCB)的电荷改变,其可通过例如离子交换色谱或icIEF进行评估。

[0129] 如果蛋白质(例如,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB))在给定时间的生物活性处于在制备药物制剂时所表现出的生物活性的约20%以内(诸如在约10%以内)(在测定误差内),如例如在受体结合测定中所确定,则该蛋白质(例如,治疗性蛋白质)"保留其生物活性"。

[0130] 如本文所用,蛋白质(例如,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB))的"生物活性"是指蛋白质(例如,治疗性蛋白质(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB))结合其靶标的能力,例如,抗体结合其抗原的能力的能力(例如,TDB或TCB结合T细胞和/或靶标细胞的能力)。其可进一步包括可在体外或体内测量的生物反应。这种活性可以为拮抗的或激动的。

[0131] "对氧化敏感"的蛋白质(例如,治疗性蛋白质,诸如双特异性抗体,例如TDB或TCB)为包含一个或多个已被发现易于氧化的残基(诸如,但不限于甲硫氨酸(Met)、半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr))的蛋白质。例如,治疗性蛋白质(诸如TDB或TCB)中的一个或多个甲硫氨酸残基可能对氧化敏感。

[0132] 术语"氧化百分比"是指制剂(例如,药物组合物)中蛋白质(例如,治疗性蛋白质)在特定氨基酸残基(例如,Met残基)处被氧化的百分比。氧化百分比可通过例如一种或多种胰蛋白酶肽(其中存在一个或多个特定的易于氧化的氨基酸残基)的质谱(MS)分析来确定。例如,可以从蛋白质(例如,治疗性蛋白质)或其药物组合物的初始生产起9个月、12个月、18个月或两年内,在AAPH应力测试后确定氧化百分比。

[0133] 如本文所用,术语"如通过AAPH应力测试所评定"意指通过在约40℃用AAPH(例如,约0mM AAPH、约1mM AAPH、约3mM AAPH、约3.5mM AAPH或约5mM AAPH)配制蛋白质(例如,治疗性蛋白质,例如,TDB或TCB)后约24小时(例如,在约10mg/ml治疗性蛋白质、约10mM组氨酸乙酸盐、约240mM蔗糖、约0.06(w/v)聚山梨醇酯20的制剂(pH约5.8)中)的胰蛋白酶肽的质谱分析所确定的特定氨基酸残基(例如,Met残基)处的氧化百分比。用胰蛋白酶消化应力蛋白(例如,治疗性蛋白质,例如TDB或TCB),并且消化的肽经历LC-MS-MS以确定氧化百分比。

[0134] 如本文所用,“缓冲液”是指通过酸-碱缀合物组分的作用来抵抗pH变化的缓冲溶液(在本文中也称为“缓冲剂”)。在一些实施例中,本公开的缓冲液具有约4.5至约8范围内的pH。在一些实施例中,缓冲液具有在约5.1至6.1范围内(例如,约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6.0或约6.1)的pH,例如,约pH 5.5或5.8。在特定实施例中,缓冲液的pH为约5.5。在另一特定实施例中,缓冲液的pH为约5.8。在本公开中使用的示例性缓冲剂包括但不限于组氨酸(例如,组氨酸乙酸盐或组氨酸盐酸盐(HCl))、乙酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐或其组合。在一些实施例中,组氨酸为组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸三钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸三钾或其混合物。在特定实施例中,缓冲剂为组氨酸HCl或组氨酸乙酸盐。

[0135] 如本文所用,“张度剂”是指可添加至液体(例如,水溶液)以调整所述液体的张度的药剂。张度是指两种溶液之间的渗透压梯度的量度。在一些实施例中,张度剂不能穿过半透膜(例如,半透细胞膜),该半透膜允许液体(例如,水溶液)或液体的其他组分(例如,其他溶质)穿过。在一些实施例中,张度剂用于通过防止应用部位处的渗透压冲击来减少局部刺激(例如,在皮下施用时)。示例性张度剂包括碳水化合物(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、甘油、丙三醇、甘露醇和海藻糖)、氨基酸和盐(例如,氯化钠和氯化钾)。

[0136] 如本文所用,“表面活性剂”是指表面活化剂,优选非离子型表面活性剂。本文的表面活性剂的示例包括聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯85);泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188);TRITON®;十二烷基硫酸钠;月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基、肉豆蔻基、亚油基或硬脂基磺基甜菜碱;月桂基、肉豆蔻基、亚油基或硬脂酰基肌氨酸;亚油基、肉豆蔻基或十六烷基甜菜碱;月桂酰氨基丙基、椰油酰胺丙基、亚油酰胺丙基、肉豆蔻酰胺丙基、棕榈酰氨基丙基或异硬脂酰胺丙基甜菜碱(例如月桂酰胺丙基);肉豆蔻基胺丙基、棕榈酰丙基或异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺;甲基椰油酰基钠或甲基油基-牛磺酸二钠;和MONAQUAT™系列(Mona Industries,Inc.,Paterson,N.J.);聚乙二醇、聚丙二醇以及乙二醇与丙二醇的共聚物(例如,PLURONIC®嵌段共聚物,例如PLURONIC®F-68);等。在一个实施例中,本文的表面活性剂为聚山梨醇酯20(PS20)。在又一实施例中,本文的表面活性剂为泊洛沙姆188(P188)。

[0137] “防腐剂”是可以任选地包含在制剂中以基本上减少其中的细菌作用,从而促进例如多用途制剂的生产的化合物。潜在的防腐剂的实例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲基氯化铵、苯扎氯铵(烷基苄基二甲基氯化铵的混合物,其中烷基为长链化合物)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳族醇,诸如苯酚、丁醇和苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚。在一个实施例中,本文的防腐剂为苯甲醇。在一些实施例中,制剂不包括防腐剂。

[0138] “表面活性剂与治疗性蛋白质的摩尔比”(表面活性剂:蛋白质)为表面活性剂与治疗性蛋白质的比率,其中每种组分以克分子浓度(也称为摩尔浓度)表示。等式(1)描绘了该比率:

[0139] $$摩尔比(表面活性剂:蛋白质)=\frac{表面活性剂M}{治疗性蛋白质M} \quad (1)$$

[0140] 如本文所用,“原料药”或“DS”是指被配制用于在向受试者施用之前储存(例如,冷冻储存)的药物组合物。DS具有的治疗性蛋白质的浓度可大于待向受试者施用的治疗性蛋白质的浓度。因此,在一些情况下,DS在向受试者施用之前被稀释。

[0141] 如本文所用,“药物产品”或“DP”是指呈其最终构造以使其准备好向受试者施用(例如,呈最终的小瓶构造)的药物组合物。DP中治疗性蛋白质的浓度可为待向受试者施用的浓度。替代性地,如果DP与稀释剂一起施用,或者如果其旨在与其他治疗试剂组合施用,则DP的浓度可能高于其待向受试者施用的浓度

[0142] 在本申请中,除非另有说明,否则所使用的技术可以参见以下几个众所周知的参考文献,诸如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Sambrook等人,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press),PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Innis等人1990.Academic Press,San Diego,CA),以及Harlow和Lane(1988)Antibodies:ALaboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0143] 适当地,除非另有说明,否则通常根据制造商定义的方案和/或参数进行涉及使用市售试剂盒和试剂的程序。因此,在描述本发明的方法和用途之前,应当理解的是,本公开不限于所描述的具体方法、方案、细胞系、动物物种或属、构建体和试剂,当然这些均可以改变。也应理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并不旨在限制本发明的范围,本公开的范围仅由所附权利要求书限制。

[0144] 如本文所用,术语“多肽”是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”是指具有两个或更多个氨基酸的任何链,而不是指产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指代具有两个或更多个氨基酸的链的任何其他术语包括在“多肽”的定义内,并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一者使用,或与这些术语中的任何一者可互换地使用。术语“多肽”还旨在指代多肽的表达后修饰产物,所述表达后修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、用已知保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割,或用非天然存在的氨基酸进行修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生,而不一定从指定的核酸序列翻译而来。它可以以任何方式生成,包括通过化学合成。本公开的多肽的大小可为约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个或2,000个或更多个氨基酸。多肽可以具有确定的三维结构,但它们不一定具有这种结构。具有确定的三维结构的多肽被称为折叠的;并且不具有确定的三维结构,而是可以采用大量不同构象的多肽则被称为未折叠的。

[0145] “分离的”多肽或变体或其衍生物意指不是处于其天然环境中的多肽。不需要特定的纯化水平。例如,可以从多肽的天然或自然环境中移出分离的多肽。在宿主细胞中表达的重组产生的抗体被认为是出于本发明的目的而分离的,已经通过任何合适的技术分离、分级或者部分或基本上纯化的天然或重组抗体也被认为是出于本发明的目的而分离的。

[0146] 本文中的术语“抗体”以最广义使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB)和抗体片段,只要它们表现出预期抗原结合活性即可(例如,抗体的抗原结合片段)。

[0147] 如本文所用,术语“抗原结合分子”在其最广泛意义上是指特异性结合抗原决定簇

的分子。抗原结合分子的实例是免疫球蛋白及其衍生物,例如其片段。

[0148] “抗体片段”是指除了完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括(但不限于)Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)$_2$、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv)和从抗原片段形成的多特异性抗体。

[0149] “结合结构域”是指与靶表位、抗原、配体或受体特异性结合的化合物或分子的一部分。结合结构域可为以下分子的部分,诸如抗体(例如,单克隆、多克隆、重组、人源化和嵌合抗体)、抗体片段或其一部分(例如,Fab片段,Fab’$_2$、scFv抗体、SMIP、结构域抗体、双抗体、微抗体、scFv-Fc、亲合体、纳米抗体和抗体的VH结构域和/或VL结构域)、受体、配体、适体和具有鉴定出的结合配偶体的其他分子。

[0150] 如本文所用,术语“抗原结合部分”是指特异性地结合抗原决定簇的多肽分子。在一个实施例中,抗原结合部分能够将其所附接的实体(例如,细胞因子或第二抗原结合部分)引导至靶标位点,例如引导至带有抗原决定位的特定类型的肿瘤细胞或肿瘤基质。抗原结合部分包括如本文进一步定义的抗体及其片段。优选的抗原结合部分包括抗体的抗原结合结构域,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区。在某些实施例中,抗原结合部分可包括如本文进一步定义且在本领域中已知的抗体恒定区。可用的重链恒定区包括以下五种同种型中的任一种:α、δ、ε、γ或μ。可用的轻链恒定区包括以下两种同种型中的任一种:κ和λ。

[0151] “交叉”Fab分子(也称为“Crossfab”)意指Fab分子,其中Fab重链和Fab轻链的可变结构域或恒定结构域被交换(即彼此替换),即,交叉Fab分子包含由轻链可变结构域VL和重链恒定结构域1CH1构成的肽链(VL-CH1,在N末端至C末端方向)、以及由重链可变结构域VH和轻链恒定结构域CL构成的肽链(VH-CL,在N末端至C末端方向)。为清楚起见,在其中Fab轻链的可变结构域和Fab重链的可变结构域发生交换的交叉Fab分子中,包含重链恒定结构域1CH1的肽链在本文中称为(交叉)Fab分子的“重链”。相反地,在其中Fab轻链的恒定结构域和Fab重链的恒定结构域发生交换的交叉Fab分子中,包含重链可变结构域VH的肽链在本文中称为(交叉)Fab分子的“重链”。

[0152] 与此相反,“常规”Fab分子意指其自然形式(即包含由重链可变结构域和恒定结构域构成的重链(VH-CH1,在N末端至C末端方向)以及由轻链可变结构域和恒定结构域构成的轻链(VL-CL,在N末端至C末端方向))的Fab分子。

[0153] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指在序列中高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的抗体可变结构域的区域每一种。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文中的示例性HVR包括:

[0154] (a)在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处发生的高变环:(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0155] (b)在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处发生的CDR(Kabat等人,同上所述);

[0156] (c)在氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处发生的抗原接触点(MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996));以及

[0157] (d)(a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

[0158] 除非另外指明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等人,出处同上编号。

[0159] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。)单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可分别使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域来进行分离,以筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0160] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,该C末端区包含恒定区的至少一部分。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施例中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,同上所述。

[0161] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常在VH(或VL)中以如下序列出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0162] 相对于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”或“序列同一性百分比(%)”被定义为在比对候选序列与参考多肽序列并引入空位(如果必要的话)以实现最大的序列同一性百分比之后,并且在不考虑将任何保守取代作为序列同一性的组成部分的情况下,与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的候选序列中的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN®(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2来生成氨基酸序列同一性%。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司(Genentech,Inc.)编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到U.S.Copyright Office,Washington D.C.,20559,在那里以美国版权登记号TXU510087注册。ALIGN-2程序可从基因泰克公司(Genentech,Inc.,South San Francisco,California)公开获得,或者可以从源代码编译。ALIGN-2程序应编译为在UNIX®操作系统(包括数字UNIX®V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置并且不变。

[0163] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其可以替代性地表达为给定氨基酸序列A具有或包含与给定氨基酸序列B的某一氨基酸序列同一性%)计算如下:

[0164] 100乘以分数X/Y

[0165] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序对A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,而其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别指明,否则本文所使用的所有氨基酸序列同一性%的值是如前一

段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0166] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,在该抗体中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同的来源或物种。

[0167] “人共有框架”是这样的框架,其表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列的亚组为如Kabat等人同上所述的亚组。在一个实施例中,对于VL,亚组为如Kabat等人同上所述的亚组κI。在一个实施例中,对于VH,亚组为如Kabat等人同上所述的亚组III。

[0168] “人源化”抗体是指这样的嵌合抗体,其包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些实施例中,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个,通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经历人源化的抗体。

[0169] 术语“全长抗体”、“完整抗体”及“全抗体”在本文中可互换地用于指代具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0170] “人抗体”是这样的抗体,该抗体具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列,或来源于利用人抗体全套库或其他人抗体编码序列的非人源的抗体的氨基酸序列。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人类抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。还可用于制备人类单克隆抗体的方法如Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)所述。另参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.,5:368-74(2001)。可通过向抗原施用转基因动物来制备人类抗体,该转基因动物已被修饰以对抗原攻击产生应答而产生此类抗体,但其内源基因座已失效,例如,免疫异种小鼠(参见例如,关于XENOMOUSE™技术的美国专利第6,075,181号和第6,150,584号)。另参见,例如,Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)关于通过人类B细胞杂交瘤技术产生的人类抗体。

[0171] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能的变体抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的生产期间产生,此类变体通常以少量形式存在)之外,包括该群体的个别抗体具有同一性和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,待根据本公开的供使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,在本文中描述了用于制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0172] “裸抗体”是指不缀合至异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射性标记物的抗体。裸抗体可存在于药物组合物中。

[0173] “天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体

为约146,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由经二硫键键合的两条相同轻链和两条相同重链组成。从N末端至C末端,每条重链具有可变区(VH),也称为变异重链结构域或重链可变结构域,随后为三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,自N末端至C末端,各轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,继之以恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,这两种类型称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0174] 如本文所用,术语“半抗体”是指与一条免疫球蛋白轻链缔合的一条免疫球蛋白重链。

[0175] “分离的”抗体为已从其自然环境的组分中分离的抗体。在一些实施例中,通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(isoelectric focusing,IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)测定,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度。关于评定抗体纯度的方法的综述,请参见例如Flatman等人,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0176] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些抗体中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。

[0177] 如本文所用,术语“分化簇3”或“CD3”涉及来自任何脊椎动物来源的任何天然CD3,包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人类和食蟹猴(cyno))和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠),除非另外指明,包括例如CD3ε、CD3γ、CD3α和CD3β链。该术语涵盖“全长”的未加工CD3(例如,未加工或未修饰的CD3ε或CD3γ),以及通过细胞中加工产生的任何形式的CD3。该术语还涵盖CD3的天然存在变体,包括,例如,剪接变体或等位基因变体。CD3包括例如人类CD3ε蛋白(NCBI RefSeq编号NP_000724),其长度为207个氨基酸;人CD3γ蛋白(NCBI RefSeq编号NP_000064),其长度为182个氨基酸,食蟹猴CD3ε蛋白(NCBI RefSeq编号NP_001270544.1),其长度为198个氨基酸;以及食蟹猴CD3γ蛋白(NCBI RefSeq编号NP_001270839.1),其长度为181个氨基酸。

[0178] 除非另外指明,否则如本文所用的术语“分化簇20”或“CD20”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CD20,该脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如,人)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语包括“全长”的未加工CD20,以及通过细胞中加工产生的任何形式的CD20。该术语还涵盖CD20的天然存在变体,包括,例如,剪接变体或等位基因变体。CD20包括例如人CD20蛋白(参见例如NCBI RefSeq编号NP_068769.2和NP_690605.1),其长度为297个氨基酸并且可例如从缺少5'UTR的一部分的变异mRNA转录本(参见例如NCBI RefSeq编号NM_021950.3)或更长的变异mRNA转录本(参见例如NCBI RefSeq编号NM_152866.2)产生。

[0179] 如本文所用,术语“FcRH5”或“片段可结晶受体样5”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然FcRH5,包括哺乳动物,例如灵长类动物(例如,人类)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠),除非另外指明,其包括“全长”未处理的FcRH5,以及因在细胞中处理所产生的任何形式的FcRH5。该术语还涵盖FcRH5的天然存在变体,包括,例如,剪接变体或等位基因变体。FcRH5包括例如人类FcRH5蛋白(UniProtKB/Swiss-ProtID:Q96RD9.3),其长度为977个氨基酸。

[0180] 除非另有说明,否则如本文所使用的术语“HER2”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然HER2,该脊椎动物包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人类)以及啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语包括“全长”的未加工HER2,以及通过细胞中加工产生的任何形式的HER2。该术语还涵盖HER2的天然存在变体,包括,例如,剪接变体或等位基因变体。HER2包括例如,人HER2蛋白(参见例如NCBI RefSeq编号NP_001276865),其长度为1240个氨基酸。HER2的结构域IV是定位在最靠近细胞膜的细胞外蛋白区。结构域IV具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0181] 术语“抗CD20/抗CD3抗体”、“抗CD20/抗CD3抗体”、“抗CD20/抗CD3 TDB”和“抗CD20/抗CD3 TCB”或其变体是指能够以足够亲和力与CD20和CD3结合,从而使得该抗体可用为靶向CD20和/或CD3的诊断剂和/或治疗剂的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一个实施例中,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的,抗CD20/抗CD3抗体与不相关的非CD3蛋白质和/或非CD20蛋白质结合的程度小于该抗体与CD3和/或CD20结合程度的约10%。在某些实施例中,与CD20和/或CD3中的每一者结合的抗CD20/抗CD3双特异性抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如,10^{-8}M至10^{-13}M,例如,10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在某些实施例中,抗CD20/抗CD3抗体与在来自不同物种的CD3之间保守的CD3表位和/或在来自不同物种的CD20之间保守的CD20表位结合。可用于本公开的方法中的抗CD20/抗CD3双特异性抗体包括PCT公开号WO 2015/095392中所述的任何抗CD20/抗CD3双特异性抗体,该PCT全文通过引用以其整体并入本文。在一些情况下,抗CD20/抗CD3双特异性抗体为抗CD20/抗CD3 T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)。在特定实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体为莫苏尼妥珠单抗(也称为BTCT4465A或RG 7828),如国际非专利药名(INN)清单117(WHO Drug Information,第31卷,第2期,2017年,第304-305页)所定义的。在其他实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体为美国专利第9,914,776号中所述的T细胞活化双特异性抗原结合分子(例如,2+1TCB),该专利全文通过引用以其整体并入本文。在特定实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体为格菲妥单抗(也称为RO 7082859或RG6026),如国际非专利药名(INN)清单121所定义(WHO Drug Information(国际非专利药名),推荐INN:清单83,2020年,第34卷,第1期,第39页),并且CAS注册编号为2229047-91-8。

[0182] 术语“抗FcRH5/抗CD3抗体”、“抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体”、“抗FcRH5/抗CD3 TDB”或其变体是指能够以足够亲和力与FcRH5和CD3结合,从而使得该抗体可用为靶向FcRH5和/或CD3的诊断剂和/或治疗剂的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一个实施例中,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的,抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体与不相关的非CD3蛋白质和/或非FcRH5蛋白质结合的程度小于该抗体与CD3和/或FcRH5结合程度的约10%。在某些实施例中,与FcRH5和/或CD3中的每一者结合的抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如,10^{-8}M至10^{-13}M,例如,10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在某些实施例中,抗FcRH5/抗CD3抗体与在来自不同物种的CD3之间保守的CD3表位和/或在来自不同物种的FcRH5之间保守的FcRH5表位结合。可用于本公开的方法中的抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体包括PCT公开号WO 2016/205520、WO 2015/095392和WO 2014/210064以及美国专利第10,323,094号中所述的任何抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体,这些专利通过引用以其整体并入本文。在一些情况下,

抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体为抗FcRH5/抗CD3 T细胞依赖性双特异性抗体。在特定实施例中,抗FcRH5抗体为西沃司他单抗(也称为BFCR4350A或RO7187797),描述于WHO药物信息(国际非专利药名),推荐INN:清单84,第34卷,第3期,2020年出版(参见第701页)中,并且具有2249888-53-5的CAS注册号。西沃司他单抗为结合FcRH5和CD3的Fc工程化、人源化、全长非糖基化IgG1κT细胞依赖性双特异性抗体(TDB)。

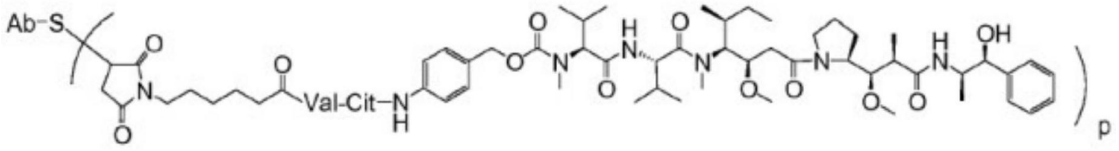
[0183] 术语“抗HER2/抗CD3抗体”、“抗HER2/抗CD3双特异性抗体”、“抗HER2/抗CD3 TDB”或其变体是指能够以足够亲和力与HER2和CD3结合,从而使得该抗体可用为靶向HER2和/或CD3的诊断剂和/或治疗剂的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一个实施例中,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的,抗HER2/抗CD3双特异性抗体与不相关的非CD3蛋白质和/或非HER2蛋白质结合的程度小于该抗体与CD3和/或HER2结合程度的约10%。在某些实施例中,与HER2和/或CD3中的每一者结合的抗HER2/抗CD3双特异性抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如,10^{-8}M至10^{-13}M,例如,10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在某些实施例中,抗HER2/抗CD3抗体与在来自不同物种的CD3之间保守的CD3表位和/或在来自不同物种的HER2之间保守的HER2表位结合。可用于本公开的方法中的抗HER2/抗CD3双特异性抗体包括PCT公开号WO 2015/095392中所述的任何抗HER2/抗CD3双特异性抗体,该PCT通过引用以其整体并入本文。在一些情况下,抗HER2/抗CD3双特异性抗体为抗HER2/抗CD3 T细胞依赖性双特异性抗体。在特定实施例中,抗HER2/抗CD3双特异性抗体(抗HER2/抗CD3 TDB)为芦莫妥单抗,如国际非专利药名(INN)清单124(WHO药物信息,第34卷,第4期,2020,第1031页)中所定义,并且CAS注册号为2361325-98-4。

[0184] 除非另外指明,否则如本文所使用的术语“分化簇79b”或“CD79b”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CD79b,该脊椎动物包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人类)和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语包括“全长”的未加工CD79b,以及通过细胞中加工产生的任何形式的CD79b。该术语还涵盖CD79b的天然存在变体,包括,例如,剪接变体或等位基因变体。CD79b包括例如人类CD79b蛋白(NCBI RefSeq编号NP_000617),其长度为229个氨基酸。

[0185] 术语“抗CD79b抗体”和“结合CD79b的抗体”是指这样的抗体,其能够以足够的亲和力结合CD79b,使得所述抗体可用作靶向CD79b的诊断和/或治疗剂。在一个实施例中,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的,抗CD79b抗体与不相关的非CD79b蛋白的结合程度小于该抗体与CD79b的结合程度的约10%。在某些实施例中,与CD79b结合的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM、或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更低,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}至10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在某些实施例中,抗CD79b抗体与CD79b的表位结合,该表位在来自不同物种的CD79b中是保守的。

[0186] 如本文所用,术语“维泊妥珠单抗”是指具有IUPHAR/BPS编号8404、KEGG编号D10761或CAS注册编号1313206-42-6的抗CD79b抗体药物缀合物。维泊妥珠单抗-piiq也可互换地称为“维泊妥珠单抗(polatuzumab vedotinpiiq)”、“huMA79bv28-MC-vc-PAB-MMAE”、“DCDS4501A”或“RG7596”。

[0187] 在一些实施例中,使用包含下式的抗体药物缀合物:

[0188] 

[0189] 其中Ab为维泊妥珠单抗,并且其中p在1与8之间。在一些实施例中,抗CD79b抗体药物缀合物为huMA79bv28-MC-vc-PAB-MMAE。在一些实施例中,抗体药物缀合物为维泊妥珠单抗-piiq(CAS注册编号1313206-42-6)。

[0190] 在一些实施例中,抗体药物缀合物为维泊妥珠单抗-piiq,如WHO Drug Information,第26卷,第4期,2012年中所述(拟定INN:清单108),其通过引用以其整体明确地并入本文。如WHO Drug Information,第26卷,第4期,2012年中所示,维泊妥珠单抗-piiq具有以下结构:免疫球蛋白G1-κ奥瑞他汀(auristatin)E缀合物,抗[智人CD79B(免疫球蛋白相关的CD79β)],缀合至奥瑞他汀E的人源化单克隆抗体;γ1重链(1-447)[人源化VH(智人IGHV3-66*01(79.60%)-(IGHD)-IGHJ4*01)[8.8.13](1-120)-智人IGHG1*03(CH1 R120>K(214)(121-218),铰链(219-233)、CH2(234-343)、CH3(344-448)、CHS(449-450))(121-450)],(220-218')-二硫键(如果未缀合),具有κ轻链(1'-218')[人源化V-κ(智人IGKV1-39*01(80.00%)-IGKJ1*01)[11.3.9](1'-112')-智人IGKC*01(113'-218')];二聚体(226-226":229-229")-双二硫键;经由可裂解的马来酰亚胺己酰基-戊酰基-瓜胺酸基-对氨基苄基氨基甲酸酯(mc-val-cit-PABC)接头,以平均3与4个半胱氨酰基缀合至单甲基奥瑞他汀E(MMAE)。

[0191] "受试者"或"个体"为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如,牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人和非人类灵长类动物诸如猴)、兔以及啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施例中,受试者或个体为人类。

[0192] 如本文所用,"施用"意指向受试者给予一定剂量的治疗性蛋白质(例如,TDB或TCB)或组合物(例如,药物组合物,例如包括本公开的治疗性蛋白质(例如,TDB或TCB)的药物组合物)的方法。例如,本文所述的方法中所用的药物组合物可例如经静脉内、皮下、皮内、肌内、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、外用、肿瘤内、腹膜、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐内、眼内、口服、外用、局部、通过吸入、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过局部灌注直接浸泡靶标细胞、通过导管、通过灌洗、以乳剂或以脂质组合物的形式来施用。施用方法可以根据多种因素而变化(例如,施用的药物组合物以及待治疗的病况、疾病或疾患的严重程度)。

[0193] 如本文所用,"一周"是7天±2天。

[0194] 如本文所用,"治疗(treatment)"(及其语法变型,诸如"治疗(treat)"或"治疗(treating)")是指试图改变所治疗个体的自然进程的临床干预,并且可以是为了预防或在临床病理学的进程期间进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施例中,本公开的药物组合物用于延迟疾病发展或减慢疾病的进展。

[0195] 如本文所用,"增强受试者的免疫功能"意指诱导、引起、刺激、维持或放大先天或适应性免疫反应。在一些实施例中,增强免疫功能包括增强T细胞功能。在一些实施例中,增强的水平为至少50%,替代性地为60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%。衡量

这种增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0196] 如本文所用,“增强T细胞功能”意指诱导、引起或刺激T细胞以具有持续或放大的生物功能,或恢复或重新活化耗竭的或无活性的T细胞。增强T细胞功能的示例包括:相对于干预前的水平,γ干扰素从CD8+T细胞的分泌增加、增殖增加、抗原反应性(例如,病毒、病原体或肿瘤清除率)增加。在一些实施例中,增强的水平为至少50%,替代性地为60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%、400%、500%。衡量这种增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0197] 如本文所用,病症或疾病的“延迟进展”意指延缓、阻碍、减缓、延迟、稳定和/或推迟疾病或病症(例如,细胞增殖性病症,例如,癌症)的发展。这种延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或待治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,充分或显著延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会患该病。例如,晚期癌症,诸如转移的发展,可能被延迟。

[0198] “减少”或“抑制”意指引起整体降低的能力,例如,总体降低20%或以上、50%或以上,或75%、85%、90%、95%或以上。在某些实施例中,减少或抑制可涉及通过抗体Fc区介导的抗体效用功能,此类效用功能具体包括补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。

[0199] “病症”是将受益于治疗的任何病状,包括但不限于慢性和急性病症或疾病,包括那些使哺乳动物易患该病症的病理性病状。

[0200] 术语“细胞增殖性疾病”和“增殖性疾病”是指与某种程度的异常细胞增殖相关的病症。在一个实施例中,所述细胞增殖性病症为癌症。在一个实施例中,所述细胞增殖性病症为肿瘤。

[0201] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以细胞生长不受控制为特征的生理状况。癌症的示例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更特定的示例包括但不限于鳞状细胞癌(例如,上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric/stomach)(包括胃肠道癌和胃肠间质瘤癌)、胰脏癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、尿道癌、肝癌(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏或肾癌(kidney or renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、浅表扩散黑素瘤、恶性雀斑黑素瘤、肢端黑素瘤、结节性黑素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤(包括低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中级别/滤泡性NHL;中级别弥漫性NHL;高级别免疫母细胞NHL;高级别成淋巴细胞NHL;高级别小无裂细胞NHL;巨块病变(bulky disease)NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和华氏巨球蛋白血症);慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性淋巴细胞白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性粒细胞白血病;和移植后淋巴组织增生性疾患(PTLD),以及与母斑病有关的异常血管增生、水肿(诸如与脑肿瘤相关的)、Meigs综合征、脑癌以及头颈部癌,以及相关转移。在某些实施例中,适合用本公开的抗体治疗的癌症包括乳腺癌、结直肠癌、胃癌、直肠癌、非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰脏癌、软组织肉瘤、卡波西肉瘤、类癌、头颈部癌、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,癌症选自:小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、神经

母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、结直肠癌(CRC)和肝细胞癌。又,在一些实施例中,癌症选自:非小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、胶质母细胞瘤和乳腺癌,包括那些癌症的转移形式。在其他实施例中,癌症选自排除霍奇金氏淋巴瘤但包括以下的一类成熟B细胞癌症:弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia,WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma,BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、无法分类的脾脏淋巴瘤/白血病、脾脏弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、变异型毛细胞白血病、重链病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、CNS的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL,腿型、老年人的EBV阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、淋巴瘤样肉芽肿、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、在HHV8相关多中心卡斯尔曼病中引起的大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤:具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤之间的特征的无法分类的B细胞淋巴瘤、和具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金氏淋巴瘤之间的特征的无法分类的B细胞淋巴瘤。

[0202] 术语"HER2阳性"癌症包含HER2水平高于正常水平的癌细胞。HER2阳性癌症的实例包括HER2阳性乳腺癌和HER2阳性胃癌。任选地,HER2阳性癌症具有2+或3+的免疫组织化学(IHC)评分和/或原位杂交(ISH)扩增比≥2.0。在一些情况下,HER2阳性癌症为HER2阳性实体瘤。另外地或替代性地,HER2阳性癌症可以为局部晚期或转移性HER2阳性癌症。在一些情况下,HER2阳性癌症为HER2阳性乳腺癌或HER2阳性胃癌。在一些实施例中,HER2阳性癌症选自由以下项组成的组:HER2阳性胃食管连接部癌、HER2阳性结直肠癌、HER2阳性肺癌(例如,HER2阳性非小细胞肺癌)、HER2阳性胰腺癌、HER2阳性膀胱癌、HER2阳性唾液管癌、HER2阳性卵巢癌(例如,HER2阳性上皮性卵巢癌)或HER2阳性子宫内膜癌。

[0203] 术语"FcRH5阳性细胞"是指包含在其表面表达FcRH5的细胞的癌症。出于确定细胞是否在表面上表达FcRH5的目的,认为FcRH5 mRNA表达与细胞表面上的FcRH5表达相关。在一些实施例中,FcRH5 mRNA的表达通过选自原位杂交和RT-PCR(包括定量RT-PCR)的方法确定。替代性地,FcRH5在细胞表面上的表达可例如在诸如免疫组织化学、FACS等方法中使用对FcRH5的抗体来确定。在一些实施例中,FcRH5为FcRH5a、FcRH5b、FcRH5c、UniProt标识符Q96RD9-2和/或FcRH5d中的一者或多者。在一些实施例中,FcRH5为FcRH5c。FcRH5阳性癌症的特定示例包括FcRH5阳性多发性骨髓瘤(MM)、FcRH5阳性慢性淋巴细胞白血病(CLL)、FcRH5阳性套细胞淋巴瘤(MCL)、FcRH5阳性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、FcRH5阳性滤泡性淋巴瘤(FL)、FcRH5阳性急性髓系白血病(AML)、FcRH5阳性骨髓增生异常综合征(MDS)、FcRH5阳性慢性髓系白血病(CML)、FcRH5阳性慢性粒单核细胞白血病、FcRH5阳性急性早幼粒细胞白血病(APL)、FcRH5阳性骨髓增生性疾患、FcRH5阳性血小板性白血病、FcRH5阳性前体B细胞急性淋巴细胞白血病(pre-B-ALL)、FcRH5阳性前体T细胞急性淋巴细胞白血病(pre-T-ALL)、FcRH5阳性肥大细胞病、FcRH5阳性肥大细胞白血病、FcRH5阳性肥大细胞肉

瘤、FcRH5阳性髓系肉瘤、FcRH5阳性淋巴细胞白血病和FcRH5阳性未分化白血病。

[0204] 如本文所用,“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖,无论是恶性还是良性,以及所有前癌性和癌性细胞和组织。如本文中所提及,术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性疾患”、“增殖性疾患”和“肿瘤”不相互排斥。

[0205] 如本文所用,术语“肿瘤抗原”可理解为那些在肿瘤细胞上呈递的抗原。这些抗原可在细胞表面上用细胞外部分呈递,其通常与分子的跨膜和细胞质部分组合。这些抗原有时只能由肿瘤细胞呈递,而不能由正常细胞呈递。肿瘤抗原可仅仅在肿瘤细胞上表达,或者与正常细胞相比可以表示肿瘤特异性突变。在这种情况下,它们被称为肿瘤特异性抗原。更常见的是由肿瘤细胞和正常细胞呈递的肿瘤抗原,并且它们被称为肿瘤相关抗原。与正常细胞相比,这些肿瘤相关抗原可过表达,或者由于与正常组织相比肿瘤组织的结构较不紧凑,因此能够用于肿瘤细胞中的抗体结合。

[0206] “效用功能”是指归因于抗体的Fc区域的那些生物活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;以及B细胞活化。

[0207] 如本文所用,术语“效应细胞”是指在其表面展示效应部分受体(例如,细胞因子受体)和/或Fc受体的淋巴细胞群体,它们通过这些受体来结合效应部分(例如,细胞因子)和/或抗体的Fc区并有助于破坏靶标细胞,例如肿瘤细胞。效应细胞可例如介导细胞毒性或吞噬反应。效应细胞包括但不限于效应T细胞,诸如$CD8^+$细胞毒性T细胞、$CD4^+$辅助T细胞、γδT细胞、NK细胞、淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK)细胞和巨噬细胞/单核细胞。

[0208] “促进Fc结构域的第一亚基和第二亚基缔合的修饰”是对肽骨架的操纵或Fc结构域亚基的翻译后修饰,其减少或防止包含Fc结构域亚基的多肽与相同多肽缔合以形成同源二聚体。如本文所用的促进缔合的修饰特别地包括对期望缔合的两个Fc结构域亚基(即Fc结构域的第一亚基和第二亚基)中的每一者所进行的单独修饰,其中该修饰彼此互补,以便促进两个Fc结构域亚基的缔合。例如,促进缔合的修饰可以改变Fc结构域亚基中的一者或两者的结构或电荷,以便分别使它们的缔合在空间上或静电上有利。因此,(异源)二聚化发生在包含第一Fc结构域亚基的多肽与包含第二Fc结构域亚基的多肽之间,这在融合至每个亚基的另外组分(例如抗原结合部分)不一致的意义上可能是不同的。在一些实施例中,促进缔合的修饰包括Fc结构域中的氨基酸突变,特别是氨基酸取代。在一个特定实施例中,促进缔合的修饰包括对Fc结构域的两个亚基中的每一个的单独氨基酸突变,特别是氨基酸取代。

[0209] “活化性Fc受体”是如下Fc受体,其在抗体的Fc区接合后,引起刺激携带受体的细胞执行效应子功能的信号传导事件。活化性Fc受体包括FcγRIIIa(CD16a)、FcγRI(CD64)、FcγRIIa(CD32)和FcαRI(CD89)。

[0210] 如本文所用,术语“工程化”、“工程化的”和“工程改造”被认为包括对肽骨架的任何操纵,或对天然存在的或重组的多肽或其片段的翻译后修饰。工程改造包括对氨基酸序列、糖基化模式或单独氨基酸的侧链基团的修饰,以及这些方法的组合。“工程改造”(特别是带有前缀“糖基”)以及术语“糖基化工程改造”包括细胞的糖基化机制的代谢工程改造,包括寡糖合成途径的遗传操作以实现在细胞中表达的糖蛋白的糖基化改变。此外,糖基化

工程改造包括突变和细胞环境对糖基化的影响。在一个实施例中,糖基化工程改造为糖基转移酶活性的改变。在一个特定的实施例中,工程改造导致改变的葡糖氨基转移酶活性和/或岩藻糖基转移酶活性。糖基化工程改造可用于获得“具有增加的GnTIII活性的宿主细胞”(例如,已被操纵以表达增加水平的一种或多种具有β(1,4)-N-乙酰基葡糖胺基转移酶III(GnTIII)活性的多肽的宿主细胞)、“具有增加的ManII活性的宿主细胞”(例如,已被操纵以表达增加水平的一种或多种具有α-甘露糖苷酶II(ManII)活性的多肽的宿主细胞)、或“具有降低的α(1,6)-岩藻糖基转移酶活性的宿主细胞”(例如,已被操纵以表达降低水平的α(1,6)糖岩藻基转移酶的宿主细胞)。

[0211] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指外源核酸已被引入其中的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和来源于该原代转化细胞的子代,不考虑传代次数。子代可能不与亲本细胞的核酸内容物完全一致,而是可能含有突变。本文包括如在原始转化细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变子代。宿主细胞为可用于产生用于本公开的蛋白质的任何类型的细胞系统。在一个实施例中,对宿主细胞进行工程化改造以允许产生具有经修饰寡糖的抗体。在某些实施例中,宿主细胞已被操纵以表达增加水平的一种或多种具有β(1,4)-N-乙酰基葡糖胺基转移酶III(GnTIII)活性的多肽。在某些实施例中,宿主细胞已被进一步操作以表达增加水平的一种或多种具有α-甘露糖苷酶II(ManII)活性的多肽。宿主细胞包括培养细胞,例如,哺乳动物培养细胞,诸如仅举几个示例CHO细胞、BHK细胞、NSO细胞、SP2/0细胞、YO骨髓瘤细胞、P3X63小鼠骨髓瘤细胞、PER细胞、PER.C6细胞或杂交瘤细胞、酵母细胞、昆虫细胞和植物细胞,但还包括转基因动物、转基因植物或培养植物或动物组织中包含的细胞。

[0212] 如本文所用,术语“具有GnTIII活性的多肽”是指能够催化将β-1,4键中的N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)残基添加至N连接寡糖的三甘露糖核心的β-连接甘露糖苷。该术语包括表现出类似于但未必相同于β(1,4)-N-乙酰基葡萄糖胺基转移酶III(也称为β-1,4-甘露糖基-糖蛋白4-β-N-乙酰基葡糖胺基转移酶(EC 2.4.1.144),根据Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology(NC-IUBMB))的活性的酶促活性(如在特定生物学测定中所测量,具有或不具有剂量依赖性)的融合多肽。在确实存在剂量依赖性的情况下,它不需要与GnTIII的相同,而是与GnTIII相比与给定活性的剂量依赖性基本相似(即,相对于GnTIII,候选多肽将表现出更大的活性或少了不超过约25倍、且优选少了不超过约十倍、且最优选少了不超过约三倍的活性)。在某些实施例中,具有GnTIII活性的多肽为包含GnTIII的催化结构域和异源高尔基体驻留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽。特别地,高尔基体定位结构域为甘露糖苷酶II或GnTI的定位结构域,最特别地为甘露糖苷酶II的定位结构域。替代性地,高尔基体定位结构域选自由以下项组成的组:甘露糖苷酶I的定位结构域、GnTII的定位结构域和α1,6核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。生成此类融合多肽和使用其产生具有增加的效应子功能的抗体的方法公开于WO2004/065540、美国临时专利申请号60/495,142和美国专利申请公开号2004/0241817中,其内容全文以引用方式明确并入本文。

[0213] 如本文所用,术语“高尔基体定位结构域”是指高尔基体驻留多肽的氨基酸序列,其负责将多肽锚定到高尔基体复合体中的位置。通常,定位结构域包含酶的氨基末端“尾

部”。

[0214] 如本文所用,术语“具有ManII活性的多肽”是指能够催化N连接寡糖的分支$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$甘露糖中间产物中的末端1,3和1,6连接α-D甘露糖残基的水解的多肽。该术语包括表现出类似于但未必相同于高尔基体α-甘露糖苷酶II(也称为甘露糖基寡糖1,3-1,6-α-甘露糖苷酶II(EC 3.2.1.114),根据Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology(NC-IUBMB))的活性的酶促活性的多肽。

[0215] 药物组合物(例如,包括治疗性蛋白质的药物组合物)的“有效量”为至少显示预期的治疗或预防结果(诸如,特定疾患(例如,细胞增殖性疾患,例如癌症)的可测量的改善)所需的最小量。本文的有效量可以根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引起预期应答的能力等因素而变化。有效量也是治疗有益作用超过治疗的任何毒性或有害作用的量。对于预防性用途,有益或预期的结果包括诸如以下的结果:降低疾病的风险、减轻严重程度或延迟疾病发作(例如,延迟疾病、其并发症以及在疾病发展期间所呈现的中间病理学表型的生物化学、组织学和/或行为症状)。对于治疗用途、有益或预期结果包括临床结果,诸如减少由疾病引起的一种或多种症状、提高患病者的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量、增强其他药物的效果(诸如通过靶向、延缓疾病进展和/或延长存活)。在癌症或肿瘤的情况下,有效量的药物可能减少癌细胞的数量;减小肿瘤大小;抑制(即,在某种程度上减慢或预期停止)癌细胞浸润进入周围器官中;抑制(即在某种程度上减慢并预期停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤的生长;和/或在某种程度上减轻与疾患有关的一种或多种症状。有效量可以一次或多次施用。出于本公开的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量为足以直接或间接地进行预防或治疗的量。如在临床背景中所理解的,与另一药物、化合物或药物组合物结合可以达到或不能达到有效量的药物、化合物或药物组合物。因此,可以在施用一种或多种治疗剂的情况下考虑“有效量”,并且如果与一种或多种其他试剂结合可以获得或实现预期结果,则可以考虑给予有效量的单一药剂。

[0216] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包括的说明书,其含有涉及此类治疗产品的使用的有关适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌和/或警告的信息。

[0217] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是指抑制PD-1轴结合配偶体与其一个或多个结合配偶体的相互作用的分子,以消除由PD-1信号传导轴上的信号传导引起的T细胞功能障碍,其结果是恢复或增强T细胞功能(例如,增殖、细胞因子产生、靶细胞杀伤)。如本文所用,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0218] 术语“PD-1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其一种或多种结合配偶体(诸如PD-L1、PD-L2)相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为抑制PD-1与其结合配偶体中的一者或多者结合的分子。在一具体方面,PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。例如,PD-1结合拮抗剂包括抗PD-1抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽以及其它减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2相互作用产生的信号传导的分子。在一个实施例中,PD-1结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的通过PD-1的信号传导所介导的或通过其的负共刺激信号,从而使功能障碍的T细胞功能障碍较少(例如,提高效应子对抗原识别的应答)。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体。在具体方面,PD-1结合拮抗剂为MDX-

1106(纳武利尤单抗)。在另一具体方面,PD-1结合拮抗剂为本文所述的MK-3475(派姆单抗)。在另一具体方面,PD-1结合拮抗剂为本文所述的AMG 404。在另一具体方面,PD-1结合拮抗剂为本文所述的REGN2810(西米普利单抗;LIBTAYO®)。在另一具体方面,PD-1结合拮抗剂为本文和PCT公开号WO 2017/058780中所述的AMP-224。

[0219] 术语"PD-L1结合拮抗剂"是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其一种或多种结合配偶体(诸如PD-1、B7-1)相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配偶体结合的分子。在一具体方面,PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和/或B7-1的结合。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体,其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其他减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其一个或多个结合配偶体(诸如PD-1、B7-1)相互作用产生的信号传导的分子。在一个实施例中,PD-L1结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的通过PD-L1的信号传导所介导的或通过其的负共刺激信号,从而使功能障碍的T细胞功能障碍较少(例如,提高效应子对抗原识别的应答)。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂为抗PD-L1抗体。在具体方面,抗PD-L1抗体为本文所述的阿特珠单抗(MPDL3280A)。在另一具体方面,抗PD-L1抗体为本文和PCT公开号WO 2016/201425中所述的MDX-1105(BMS-936559)。在仍另一具体方面,抗PD-L1抗体为本文所述的MEDI4736(德瓦鲁单抗)。

[0220] 术语"PD-L2结合拮抗剂"是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其一种或多种结合配偶体(诸如PD-1)的相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中,PD-L2结合拮抗剂是抑制PD-L2与其结合配偶体中的一者或多者结合的分子。在一具体方面,PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2与PD-1的结合。在一些实施例中,PD-L2拮抗剂包括抗PD-L2抗体,其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其他减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其结合配偶体(诸如PD-1)中的一者或多者相互作用产生的信号传导的分子。在一个实施例中,PD-L2结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的通过PD-L2的信号传导所介导的或通过其的负共刺激信号,从而使功能障碍的T细胞功能障碍较少(例如,提高效应子对抗原识别的应答)。在一些实施例中,PD-L2结合拮抗剂为免疫粘附素。

[0221] II.药物组合物

[0222] 本公开提供了包括治疗性蛋白质诸如双特异性抗体(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,抗CD20/抗CD3、抗FcRH5/抗CD3或抗HER2/抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)或T细胞接合双特异性抗体(TCB);例如,抗CD20/抗CD3、抗FcRH5/抗CD3或抗HER2/抗CD3 TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的药物组合物,及其用途,例如用于治疗细胞增殖性疾患(例如,癌症,例如血液癌症)。本公开的药物组合物可被配制为支持相对低浓度的治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体或T细胞接合双特异性抗体;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)。

[0223] 本文所述的任何治疗性蛋白质(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)均可用于药物组合物中,但应理解,还可使用其他治疗性蛋白质。

[0224] 在一方面,本公开提供一种药物组合物,该药物组合物包括治疗性蛋白质、表面活性剂(例如,聚山梨醇酯20(PS20))、稳定剂(例如,甲硫氨酸)、缓冲剂和载体。在一些实施例

中,表面活性剂(例如,PS20或P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为100或更小,例如,90或更小、80或更小、70或更小、60或更小、50或更小、40或更小、30或更小、20或更小、10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小、2或更小、或1或更小,例如,0.5至100、0.5至50、0.5至10、0.5至5、0.5至1、1至5、2至4、5至100、10至70、10至50、10至30、50至100、60至80、70至80、或40至50。在某些实施例中,表面活性剂(例如,PS20或P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为1至100。在一些实施例中,表面活性剂(例如,PS20)与治疗性蛋白质的摩尔比为45至100、45至55、50至100、60至90、70至90、60至80、70至80、65至75、或75至85,例如,约45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80。在特定实施例中,表面活性剂(例如,PS20)与治疗性蛋白质(例如,莫苏尼妥珠单抗或芦莫妥单抗)的摩尔比为约71。在另一特定实施例中,表面活性剂(例如,PS20)与治疗性蛋白质(例如,格菲妥单抗)的摩尔比为约79。在又一特定实施例中,表面活性剂(例如,PS20)与治疗性蛋白质(例如,西沃司他单抗)的摩尔比为约48。在其他实施例中,表面活性剂(例如,P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为5至50、5至25、10至15、或15至20,例如,约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在特定实施例中,表面活性剂(例如,P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为约14。在另一特定实施例中,表面活性剂(例如,P188)与治疗性蛋白质的摩尔比为约11.5。

[0225] 药物组合物可具有任何合适浓度的治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,T细胞依赖性双特异性抗体或T细胞接合双特异性抗体;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)。例如,在任何前述药物组合物中,治疗性蛋白质的浓度可为约0.01mg/ml至约30mg/ml,例如,约0.01mg/ml、约0.05mg/ml、约0.1mg/ml、约0.2mg/ml、约0.3mg/ml、约0.4mg/ml、约0.5mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml、约11mg/ml、约12mg/ml、约13mg/ml、约13.5mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml、约16mg/ml、约17mg/ml、约18mg/ml、约19mg/ml、约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml、约26mg/ml、约27mg/ml、约28mg/ml、约29mg/ml或约30mg/ml。

[0226] 例如,在一些实施例中,治疗性蛋白质为抗CD20/抗CD3 TDB,并且抗CD20/抗CD3 TDB的浓度为约0.1mg/ml至约10mg/ml、约0.1mg/ml至约5mg/ml、约0.1mg/ml至约3mg/ml、约0.1mg/ml至约2mg/ml、约0.1mg/ml至约1.5mg/ml、约0.3mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约5mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.6mg/ml至约2mg/ml、约0.7mg/ml至约2mg/ml、约0.8mg/ml至约2mg/ml、约0.9mg/ml至约10mg/ml、约0.5mg/ml至约1.4mg/ml、约0.5mg/ml至约1.3mg/ml、约0.5mg/ml至约1.2mg/ml、约0.5mg/ml至约1.1mg/ml、约0.5mg/ml至约1.5mg/ml、约0.8mg/ml至约1.2mg/ml、约1mg/ml至约10mg/ml、约2mg/ml至约10mg/ml、约3mg/ml至约10mg/ml、约4mg/ml至约10mg/ml、约5mg/ml至约10mg/ml、约6mg/ml至约10mg/ml、约7mg/ml至约10mg/ml、约8mg/ml至约10mg/ml、约9mg/ml至约10mg/ml、约1mg/ml至约5mg/ml、约1mg/ml至约3mg/ml、约1.5mg/ml至约2.5mg/ml、约1.8mg/ml至约2.2mg/ml、约2mg/ml至约5mg/ml、约3mg/ml至约5mg/ml、或约4mg/ml至约5mg/ml。在特定实施例中,抗CD20/抗CD3 TDB的浓度为约1mg/ml。在特定实施例中,抗CD20/抗CD3 TDB的浓度为约2mg/ml。

[0227] 在一些实施例中,治疗性蛋白质为抗HER2/抗CD3 TDB,并且抗HER2/抗CD3 TDB的浓度为约0.1mg/ml至约10mg/ml、约0.1mg/ml至约5mg/ml、约0.1mg/ml至约3mg/ml、约0.1mg/ml至约2mg/ml、约0.1mg/ml至约1.5mg/ml、约0.3mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约5mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.6mg/ml至约2mg/ml、约0.7mg/ml至约2mg/ml、约0.8mg/ml至约2mg/ml、约0.9mg/ml至约10mg/ml、约0.5mg/ml至约1.4mg/ml、约0.5mg/ml至约1.3mg/ml、约0.5mg/ml至约1.2mg/ml、约0.5mg/ml至约1.1mg/ml、约0.5mg/ml至约1.5mg/ml、约0.8mg/ml至约1.2mg/ml、约1mg/ml至约5mg/ml、约1mg/ml至约3mg/ml、约1.5mg/ml至约2.5mg/ml、约1.8mg/ml至约2.2mg/ml、约2mg/ml至约5mg/ml、约3mg/ml至约5mg/ml、或约4mg/ml至约5mg/ml。在一些实施例中,抗HER2/抗CD3 TDB的浓度为约0.5mg/ml至约1.5mg/ml。在特定实施例中,抗HER2/抗CD3 TDB的浓度为约1mg/ml。在另一特定实施例中,抗HER2/抗CD3 TDB的浓度为约2mg/ml。

[0228] 在一些实施例中,治疗性蛋白质为抗FcRH5/抗CD3 TDB,并且抗FcRH5/抗CD3 TDB的浓度为约0.1mg/ml至约10mg/ml、约0.1mg/ml至约5mg/ml、约0.1mg/ml至约3mg/ml、约0.1mg/ml至约2mg/ml、约0.1mg/ml至约1.5mg/ml、约0.3mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约5mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.6mg/ml至约2mg/ml、约0.7mg/ml至约2mg/ml、约0.8mg/ml至约2mg/ml、约0.9mg/ml至约10mg/ml、约0.5mg/ml至约1.4mg/ml、约0.5mg/ml至约1.3mg/ml、约0.5mg/ml至约1.2mg/ml、约0.5mg/ml至约1.1mg/ml、约0.5mg/ml至约1.5mg/ml、约0.8mg/ml至约1.2mg/ml、约1mg/ml至约5mg/ml、约1mg/ml至约3mg/ml、约1.5mg/ml至约2.5mg/ml、约1.8mg/ml至约2.2mg/ml、约2mg/ml至约5mg/ml、约3mg/ml至约5mg/ml、或约4mg/ml至约5mg/ml。在一些实施例中,抗FcRH5/抗CD3 TDB的浓度为约0.5mg/ml至约3mg/ml。在特定实施例中,抗FcRH5/抗CD3 TDB的浓度为约1mg/ml。在特定实施例中,抗FcRH5/抗CD3 TDB的浓度为约1.5mg/ml。在特定实施例中,抗FcRH5/抗CD3 TDB的浓度为约3mg/ml。

[0229] 在一些实施例中,治疗性蛋白质为抗CD20/抗CD3 TCB,并且抗CD20/抗CD3 TCB的浓度为约0.1mg/ml至约10mg/ml、约0.1mg/ml至约5mg/ml、约0.1mg/ml至约3mg/ml、约0.1mg/ml至约2mg/ml、约0.1mg/ml至约1.5mg/ml、约0.3mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.5mg/ml至约5mg/ml、约0.5mg/ml至约2mg/ml、约0.6mg/ml至约2mg/ml、约0.7mg/ml至约2mg/ml、约0.8mg/ml至约2mg/ml、约0.9mg/ml至约10mg/ml、约0.5mg/ml至约1.4mg/ml、约0.5mg/ml至约1.3mg/ml、约0.5mg/ml至约1.2mg/ml、约0.5mg/ml至约1.1mg/ml、约0.5mg/ml至约1.5mg/ml、约0.8mg/ml至约1.2mg/ml、约1mg/ml至约5mg/ml、约1mg/ml至约3mg/ml、约1.5mg/ml至约2.5mg/ml、约1.8mg/ml至约2.2mg/ml、约2mg/ml至约5mg/ml、约3mg/ml至约5mg/ml、或约4mg/ml至约5mg/ml。在一些实施例中,抗CD20/抗CD3 TCB的浓度为约0.5mg/ml至约1.5mg/ml。在特定实施例中,抗CD20/抗CD3 TCB的浓度为约1mg/ml。

[0230] 所公开的药物组合物包括表面活性剂。可使用任何合适的表面活性剂。在一些实施例中,表面活性剂为非离子表面活性剂(例如,聚山梨醇酯(聚氧乙烯(n)山梨醇酐单月桂酸酯)、泊洛沙姆、聚氧乙烯烷基醚、烷基苯基聚氧乙烯醚或其组合)。在一些实施例中,非离子表面活性剂为聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20(PS20;例如,聚氧乙烯(20)山梨醇酐单月桂酸酯,例如TWEEN 20®;例如,Super Refined™ PS20(已经历专有快速色谱法以获得更高纯度的PS20,并且可获自Avantor Performance Materials,LLC(Center Valley,PA,

U.S.))或聚山梨醇酯80(PS80;例如,聚氧乙烯(20)山梨醇酐单油酸酯,例如TWEEN 80®;例如,Super Refined™ PS80(Avantor))。在特定实施例中,聚山梨醇酯为聚山梨醇酯20(PS20)。在其他实施例中,非离子表面活性剂为泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188,聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇))。

[0231] 可使用任何合适浓度的表面活性剂。药物组合物中的表面活性剂的浓度可基于表面活性剂与治疗性蛋白质的预期比率和治疗性蛋白质的浓度来选择。在本文所述的任何药物组合物的一些实施例中,表面活性剂(例如,PS20或P188)的浓度为约0.001%(w/v)至约2%(w/v),例如,约0.001%、约0.005%、约0.01%、约0.02%、约0.03%、约0.04%、约0.05%、约0.06%、约0.07%、约0.08%、约0.09%、约0.1%、约0.15%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%或约2%(w/v)。在一些实施例中,表面活性剂(例如,PS20或P188)的浓度为约0.01%(w/v)至约0.12%(w/v)。在一些实施例中,表面活性剂(例如,PS20或P188)的浓度为约0.05%(w/v)至约0.12%(w/v)。在特定实施例中,表面活性剂为PS20并且PS20的浓度为约0.06%(w/v)。在另一特定实施例中,表面活性剂为PS20并且PS20的浓度为约0.0.05%(w/v)。在又一特定实施例中,表面活性剂为PS20并且PS20的浓度为约0.12%(w/v)。在某些实施例中,表面活性剂为P188并且P188的浓度为约0.08%(w/v)。

[0232] 本文所述的任何药物组合物可包括稳定剂。可使用任何合适的稳定剂。例如,在一些实施例中,稳定剂为硫代山梨醇酐、抗坏血酸、单硫代甘油、环糊精、Trolox((±)-6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-甲酸)、吡哆醇、甘露醇、金属螯合剂、氨基酸或其组合。在一些实施例中,稳定剂为氨基酸。在一些实施例中,氨基酸为甲硫氨酸、半胱氨酸、色氨酸或其组合。在特定实施例中,氨基酸为甲硫氨酸。

[0233] 可使用任何合适浓度的稳定剂(例如,甲硫氨酸)。例如,在任何前述药物组合物的一些实施例中,稳定剂(例如,甲硫氨酸)的浓度为约0.01mM至约50mM,例如,约0.01mM、约0.05mM、约0.1mM、约0.2mM、约0.3mM、约0.4mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM、约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM、约20mM、约21mM、约22mM、约23mM、约24mM、约25mM、约26mM、约27mM、约28mM、约29mM、约30mM、约31mM、约32mM、约33mM、约34mM、约35mM、约36mM、约37mM、约38mM、约39mM、约40mM、约41mM、约42mM、约43mM、约44mM、约45mM、约46mM、约47mM、约48mM、约49mM或约50mM。在一些实施例中,稳定剂(例如,甲硫氨酸)的浓度为约1mM至约50mM、约2mM至约50mM、约3mM至约50mM、约4mM至约50mM、约5mM至约50mM、约6mM至约50mM、约7mM至约50mM、约8mM至约50mM、约9mM至约50mM、约10mM至约50mM、约15mM至约50mM、约20mM至约50mM、约25mM至约50mM、约30mM至约50mM、约1mM至约40mM、约2mM至约40mM、约3mM至约40mM、约4mM至约40mM、约5mM至约40mM、约5mM至约40mM、约6mM至约40mM、约7mM至约40mM、约8mM至约40mM、约9mM至约40mM、约10mM至约40mM、约15mM至约40mM、约20mM至约40mM、约25mM至约40mM、约30mM至约40mM、约1mM至约30mM、约2mM至约30mM、约3mM至约30mM、约4mM至约30mM、约5mM至约30mM、约6mM至约30mM、约7mM至约30mM、约8mM至约30mM、约9mM至约30mM、约10mM至约30mM、约11mM至约30mM、约12mM至约30mM、约13mM至约30mM、约14mM至约30mM、约15mM至约30mM、约20mM至约30mM、约25mM至约30mM、约1mM至约

20mM、约2mM至约20mM、约3mM至约20mM、约4mM至约20mM、约5mM至约20mM、约6mM至约20mM、约7mM至约20mM、约8mM至约20mM、约9mM至约20mM、约10mM至约20mM、约11mM至约20mM、约12mM至约20mM、约13mM至约20mM、约14mM至约20mM、约15mM至约20mM、约1mM至约15mM、约2mM至约15mM、约3mM至约15mM、约4mM至约15mM、约5mM至约15mM、约6mM至约15mM、约7mM至约15mM、约8mM至约15mM、约9mM至约15mM、约10mM至约15mM、约11mM至约15mM、约12mM至约15mM、约13mM至约15mM、约14mM至约15mM、约1mM至约10mM、约2mM至约10mM、约3mM至约10mM、约4mM至约10mM、约5mM至约10mM、约6mM至约10mM、约7mM至约10mM、约8mM至约10mM、约9mM至约10mM、约1mM至约5mM、约2mM至约5mM、约3mM至约5mM、或约4mM至约5mM。

[0234] 在一些实施例中,甲硫氨酸的浓度为2.5mM至20mM(例如,2.5mM至5mM、5mM至7.5mM、7.5mM至10mM、10mM至12.5mM、12.5mM至15mM、15mM至17.5mM、或17.5mM至20mM,例如,3mM至18mM、4mM至16mM、5mM至14mM、或8mM至12mM,例如,约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM或约20mM)。在特定实施例中,甲硫氨酸的浓度为约10mM。

[0235] 在其中治疗性蛋白质含有Fc区(例如,抗体,例如双特异性抗体,例如TDB,例如抗CD20/抗CD3抗体,例如莫苏尼妥珠单抗)的药物组合物中,Fc区的位置257处的甲硫氨酸的氧化在40℃历经两周而小于约10%(例如,在40℃历经两周而小于9%、小于8%、小于7%、小于6%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%)。在特定实施例中,Fc区的位置257处的甲硫氨酸的氧化在40℃历经两周而不大于约6%。

[0236] 任何前述组合物(例如,药物组合物)均可进一步包括缓冲剂。可使用任何合适的缓冲剂。在一些实施例中,缓冲剂为组氨酸、乙酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐或其组合。在一些实施例中,组氨酸为组氨酸乙酸盐。替代缓冲剂包括磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸三钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸三钾或其混合物。

[0237] 在某些情况下,缓冲剂(例如,组氨酸,例如组氨酸乙酸盐)的浓度为5mM至20mM。例如,缓冲剂可为5mM至10mM、10mM至15mM、或15mM至20mM,例如,6mM至18mM、7mM至16mM、8mM至15mM、或9mM至12mM,例如,约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM或约20mM。在特定情况下,缓冲剂(例如,组氨酸,例如组氨酸乙酸盐)的浓度可为例如8mM至12mM,例如,约8mM、约9mM、约10mM、约11mM或约12mM。在一些实施例中,缓冲剂(例如,组氨酸,例如组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl,例如L-组氨酸乙酸盐或L-组氨酸HCl)的浓度为约10mM或20mM。在特定实施例中,缓冲剂为浓度为约20mM的组氨酸HCl。在另一特定实施例中,缓冲剂为浓度为约20mM的组氨酸乙酸盐。在又一特定实施例中,缓冲剂为浓度为约10mM的组氨酸乙酸盐。

[0238] 在一些实施例中,药物组合物包括张度剂,诸如碳水化合物(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、甘油、丙三醇、甘露醇和海藻糖)、氨基酸或盐(例如,氯化钠和氯化钾)。在其中张度剂为糖的实施例中,该糖可为例如蔗糖、葡萄糖、甘油或海藻糖。在特定实施例中,糖为蔗糖。张度剂(例如,糖,例如蔗糖)的浓度可为约100mM至约500mM。例如,张度剂(例如,糖,例如蔗糖)的浓度可为诸如100mM至120mM、120mM至140mM、140mM至160mM、160mM至180mM、180mM至200mM、200mM至220mM、220mM至240mM、240mM至260mM、260mM至280mM、280mM至300mM、300mM至320mM、320mM至340mM、340mM至360mM、360mM至380mM、380mM至400mM、400mM至420mM、420mM至440mM、440mM至460mM、460mM至480mM、或480mM至500mM,例如100mM至

400mM、150mM至350mM、或200mM至300mM,例如,约100mM、约150mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约350mM、约400mM、约450mM或约500mM)。在一些实施例中,张度剂的浓度为约240mM。在特定实施例中,张度剂为蔗糖并且以约240mM的浓度存在。

[0239] 在一些实施例中,药物组合物进一步包括抗氧化剂。在一些实施例中,抗氧化剂为N-乙酰基-DL-色氨酸。在一些实施例中,N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为0.1mM至0.5mM(例如,约0.1mM、约0.15mM、约0.2mM、约0.25mM、约0.3mM、约0.35mM、约0.4mM,约0.45mM或约0.5mM)。在一些实施例中,N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为约0.3mM。

[0240] 药物组合物的pH可为任何合适的pH。在一些实施例中,药物组合物具有在4.5至约8范围内(例如,4.5至5.0、5.0至5.5、5.5至6.0、6.0至6.5、6.5至7.0、7.0至7.5、或7.5至8.0,例如,约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9,约6.0、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4、约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9或约8.0)的pH。在一些实施例中,药物组合物的pH为5.1至6.1。在特定实施例中,药物组合物的pH为约5.8。在另一特定实施例中,药物组合物的pH为约5.5。

[0241] 除上述具体组分以外,还可任选地通过混合具有期望纯度的治疗性蛋白质与一种或多种任选的药用载体(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编辑(1980))来制备本公开的呈冻干制剂或水溶液形式的药物组合物。药用载体在所用剂量和采用的浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂,诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六甲双铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇或苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇、间甲酚;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;碳水化合物,诸如单糖(例如,葡萄糖、甘露糖)、双糖(例如,蔗糖、海藻糖)或多糖(例如,糊精)或糖醇诸如甘露醇或山梨醇酐;螯合剂诸如乙二胺四乙酸(EDTA);成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,锌蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。示例性药用载体进一步包括间质药物分散剂,诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人类可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法(包括rHuPH20)描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一方面,sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0242] 示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中所描述的那些,后一种制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0243] 在一些实施例中,药物组合物呈单位剂型(例如,供输注的液体制剂、供注射的液体制剂或供稀释的液体制剂)。在特定实施例中,药物组合物为供稀释的液体制剂。在特定实施例中,在具有约50ml(例如,约40ml、约45ml、约46ml、约47ml、约48ml、约49ml、约50ml、约51ml、约52ml、约53ml、约54ml、约55ml或约60ml)的体积的容器中供应供稀释的液体制

剂。在一些实施例中,供稀释的液体制剂的体积在20ml至40ml之间(例如,在20ml至30ml之间、在30ml至40ml之间、在20ml至35ml之间、在25ml至40ml之间、在25ml至35ml之间、或在28ml至32ml之间;例如,约20ml、约25ml、约26ml、约27ml、约28ml、约29ml、约30ml、约31ml、约32ml、约33ml、约34ml、约35ml或约40ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约30ml。在一些实施例中,供稀释的液体制剂的体积在10ml至20ml之间(例如,在10ml至15ml之间、在15ml至20ml之间、在13ml至20ml之间、在10ml至17ml之间、在13ml至17ml之间、或在14ml至16ml之间;例如,约10ml、约11ml、约12ml、约13ml、约14ml、约15ml、约16ml、约17ml、约18ml、约19ml或约20ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约15ml。

[0244] 在另一特定实施例中,在具有约1ml或约2ml(例如,约0.5ml、约0.6ml、约0.7ml、约0.8ml、约0.9ml、约1ml、约1.5ml、约1.6ml、约1.7ml、约1.8ml、约1.9ml、约2ml、约2.1ml、约2.2ml、约2.3ml、约2.4ml、约2.5ml或约3ml)的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,在具有约2.5ml的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,供稀释的液体制剂的体积在0.2ml至2ml之间(例如,在0.2ml至1.5ml之间、在0.5ml至2ml之间、在0.5ml至1ml之间、或在0.8ml至1.2ml之间;例如,约0.2ml、约0.5ml、约0.6ml、约0.7ml、约0.8ml、约0.9ml、约1ml、约1.1ml、约1.2ml、约1.3ml、约1.4ml、约1.5ml或约2ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约0.5ml、约0.9ml或约1ml。

[0245] 在又一特定实施例中,在具有约15ml(例如,约10ml、约11ml、约12ml、约13ml、约14ml、约15ml、约16ml、约17ml、约18ml、约19ml或约20ml)的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,在具有约10ml的体积的容器中供应供稀释的液体制剂。在一些实施例中,供稀释的液体制剂的体积在4ml至12ml之间(例如,在4ml至8ml之间、在8ml至12ml之间、在4ml至10ml之间、在6ml至12ml之间、在6ml至10ml之间、或在7ml至9ml之间;例如,约4ml、约5ml、约6ml、约7ml、约8ml、约9ml、约10ml、约11ml或约12ml)。在特定实施例中,供稀释的液体制剂的体积为约8ml。

[0246] 在一些实施例中,液体制剂用于用稀释剂稀释。在一些实施例中,液体制剂用于用盐水溶液稀释。在一些实施例中,液体制剂用于用生理盐水溶液稀释。在一些实施例中,生理盐水溶液包含氯化钠(NaCl)。在一些实施例中,生理盐水溶液包含在0.1%至1.5%之间(例如,在0.1%至1.2%之间、在0.3%至1.5%之间、在0.4%至0.5%之间、在0.3%至1%之间、在0.8%至1%之间、在0.85%至0.95%之间;例如,约0.1%、约0.3%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.85%、约0.9%、约0.95%、约1%或约1.2%)(w/v)的NaCl)。

[0247] 在一些实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度为约0.001mg/ml至约0.6mg/ml(例如,约0.001mg/ml、约0.002mg/ml、约0.003mg/ml、约0.004mg/ml、约0.005mg/ml、约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.03mg/ml、约0.04mg/ml、约0.05mg/ml、约0.75mg/ml、约0.1mg/ml、约0.11mg/ml、约0.12mg/ml、约0.13mg/ml、约0.14mg/ml、约0.15mg/ml、约0.16mg/ml、约0.17mg/ml、约0.18mg/ml、约0.19mg/ml、约0.2mg/ml、约0.21mg/ml、约0.22mg/ml、约0.23mg/ml、约0.24mg/ml、约0.25mg/ml、约0.26mg/ml、约0.27mg/ml、约0.28mg/ml、约0.29mg/ml、约0.3mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml或约0.6mg/ml)。在特定实

施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度为约0.003mg/ml、约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.03mg/ml、约0.04mg/ml、约0.12mg/ml、约0.24mg/ml或约0.3mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗CD20/抗CD3双特异性抗体;抗CD20/抗CD3 TDB;例如,莫苏尼妥珠单抗)的浓度为约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.04mg/ml、约0.12mg/ml、约0.24mg/ml或约0.3mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗CD20/抗CD3双特异性抗体;抗CD20/抗CD3 TCB;例如,格菲妥单抗)的浓度为约0.1mg/ml或约0.6mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)的浓度为约0.003mg/ml、0.03mg/ml或0.3mg/ml。

[0248] 本文所述的制剂还可含有对于所治疗的特定适应症是必需的多于一种活性成分,优选地具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。例如,可以期望进一步提供另外的治疗剂(例如,化疗剂、细胞毒性剂、生长抑制剂和/或抗激素剂,诸如上文所述的那些)。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[0249] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或包埋在粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)。

[0250] 可以制备缓释制备物。缓释制备物的合适实例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半透性基质,所述基质是例如膜或微胶囊等成型制品的形式。

[0251] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0252] 本文所述的任何药物组合物当在5℃±3℃且避光储存时可具有至少约12个月(例如,至少约12个月、约18个月、约24个月、约30个月、约36个月、约42个月、约48个月、约54个月、约60个月、约66个月或约72个月)的保质期。在一些实施例中,药物组合物当在5℃±3℃且避光储存时具有至少36个月的保质期。在一些实施例中,组合物当在5℃±3℃且避光储存时具有至少42个月的保质期。在一些实施例中,组合物当在5℃±3℃且避光储存时具有至少48个月的保质期。

[0253] 在一些实施例中,当在5℃±3℃且避光储存时的保质期在约1个月与约72个月之间(例如,约1个月、约5个月、约10个月、约15个月、约20个月、约24个月、约25个月、约30个月、约35个月、约40个月、约45个月、约48个月、约50个月、约55个月、约60个月、约65个月、约70个月或约72个月)。在一些实施例中,当在5℃±3℃且避光储存时的保质期在约1个月与约72个月之间、约1个月与约70个月之间、约1个月与约65个月之间、约1个月与约60个月之间、约1个月与约55个月之间、约1个月与约50个月之间、约1个月与约48个月之间、约1个月与约45个月之间、约1个月与约40个月之间、约1个月与约35个月之间、约1个月与约30个月之间、约1个月与约25个月之间、约1个月与约24个月之间、约1个月与约20个月之间、约1个月与约18个月之间、约1个月与约15个月之间、约1个月与约12个月之间、约1个月与约9个月之间、约1个月与约6个月之间、约1个月与约3个月之间、约5个月与约72个月之间、约5个月

与约70个月之间、约5个月与约65个月之间、约5个月与约60个月之间、约5个月与约55个月之间、约5个月与约50个月之间、约5个月与约48个月之间、约5个月与约45个月之间、约5个月与约40个月之间、约5个月与约35个月之间、约5个月与约30个月之间、约5个月与约25个月之间、约5个月与约24个月之间、约5个月与约20个月之间、约5个月与约18个月之间、约5个月与约15个月之间、约5个月与约12个月之间、约5个月与约9个月之间、约5个月与约6个月之间、约10个月与约72个月之间、约10个月与约70个月之间、约10个月与约65个月之间、约10个月与约60个月之间、约10个月与约55个月之间、约10个月与约50个月之间、约10个月与约48个月之间、约10个月与约45个月之间、约10个月与约40个月之间、约10个月与约35个月之间、约10个月与约30个月之间、约10个月与约25个月之间、约10个月与约24个月之间、约10个月与约20个月之间、约10个月与约18个月之间、约10个月与约15个月之间、约10个月与约12个月之间、约12个月与约72个月之间、约12个月与约70个月之间、约12个月与约65个月之间、约12个月与约60个月之间、约12个月与约55个月之间、约12个月与约50个月之间、约12个月与约48个月之间、约12个月与约45个月之间、约12个月与约40个月之间、约12个月与约35个月之间、约12个月与约30个月之间、约12个月与约25个月之间、约12个月与约24个月之间、约12个月与约20个月之间、约12个月与约18个月之间、约12个月与约15个月之间、约18个月与约72个月之间、约18个月与约70个月之间、约18个月与约65个月之间、约18个月与约60个月之间、约18个月与约55个月之间、约18个月与约50个月之间、约18个月与约48个月之间、约18个月与约45个月之间、约18个月与约40个月之间、约18个月与约35个月之间、约18个月与约30个月之间、约18个月与约25个月之间、约18个月与约24个月之间、约18个月与约20个月之间、约24个月与约72个月之间、约24个月与约70个月之间、约24个月与约65个月之间、约24个月与约60个月之间、约24个月与约55个月之间、约24个月与约50个月之间、约24个月与约48个月之间、约24个月与约45个月之间、约24个月与约40个月之间、约24个月与约35个月之间、约24个月与约30个月之间、约24个月与约25个月之间、约30个月与约72个月之间、约30个月与约70个月之间、约30个月与约65个月之间、约30个月与约60个月之间、约30个月与约55个月之间、约30个月与约50个月之间、约30个月与约48个月之间、约30个月与约45个月之间、约30个月与约40个月之间、约30个月与约35个月之间、约30个月与约36个月之间、约36个月与约72个月之间、约36个月与约70个月之间、约36个月与约65个月之间、约36个月与约60个月之间、约36个月与约55个月之间、约36个月与约50个月之间、约36个月与约48个月之间、约36个月与约45个月之间、约36个月与约40个月之间、约40个月与约72个月之间、约40个月与约70个月之间、约40个月与约65个月之间、约40个月与约60个月之间、约40个月与约55个月之间、约40个月与约50个月之间、约40个月与约48个月之间、约40个月与约45个月之间、约42个月与约72个月之间、约42个月与约70个月之间、约42个月与约65个月之间、约42个月与约60个月之间、约42个月与约55个月之间、约42个月与约50个月之间、约42个月与约48个月之间、约42个月与约45个月之间、约46个月与约72个月之间、约46个月与约70个月之间、约46个月与约65个月之间、约46个月与约60个月之间、约46个月与约55个月之间、约46个月与约50个月之间、约46个月与约48个月之间、约48个月与约72个月之间、约48个月与约70个月之间、约48个月与约65个月之间、约48个月与约60个月之间、约48个月与约55个月之间、约48个月与约50个月之间、约50个月与约72个月之间、约50个月与约70个月之间、约50个月与约65个月之间、约50个月与约60个月之间、约50个月与约55个月之间、

约55个月与约72个月之间、约55个月与约70个月之间、约55个月与约65个月之间、约55个月与约60个月之间、约60个月与约72个月之间、约60个月与约70个月之间、或约60个月与约65个月之间。

[0254] 稳定的药物组合物可包括例如每ml不多于1,000个具有≥2μm的直径的颗粒。例如,药物组合物可具有每ml 900个或更少、800个或更少、700个或更少、600个或更少、500个或更少、400个或更少、300个或更少、200个或更少、或100个或更少具有≥2μm的直径的颗粒(例如,0至100个、100至200个、200至300个、300至400个、400至500个、500至600个、600至700个、700至800个、800至900个、或900至1,000个具有≥2μm的直径的颗粒)。在一些实施例中,载体为水。

[0255] 另外地或替代性地,稳定的药物组合物可具有约85%或更高的纯度。在一些实施例中,纯度为约86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高,例如,85%至90%、90%至95%、或95%至100%,例如,如通过SE-HPLC所评定。在特定实施例中,药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的约90%或更高的纯度或如通过SE-HPLC所评定的约95%或更高的纯度。在一些实施例中,药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约36个月或更久的约95%或更高的纯度(例如,如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约36个月或更久的86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高的纯度,例如,如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约36个月或更久的85%至90%、90%至95%、或95%至100%的纯度)。在特定情况下,药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的在约5℃持续约42个月或更久(例如,在约5℃持续约42个月、约60个月、约72个月、约84个月、约96个月或更久)的约95%或更高的纯度。

[0256] 在一些情况下,本公开提供药物组合物,该药物组合物具有如通过非还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)测定所评定的约75%或更高的纯度(例如,如通过非还原CE-SDS测定所评定的约76%或更高、约77%或更高、约78%或更高、约79%或更高、约80%或更高、约81%或更高、约82%或更高、约83%或更高、约84%或更高、85%或更高、约86%或更高、约87%或更高、约88%或更高、约89%或更高、约90%或更高、约91%或更高、约92%或更高、约93%或更高、约94%或更高、约95%或更高、约96%或更高、约97%或更高、约98%或更高、约99%或更高的纯度,例如,如通过非还原CE-SDS测定所评定的75%至80%、80%至85%、85%至90%、90%至95%、或95%至100%的纯度)。在特定实施例中,药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约80%或更高的纯度。例如,在一些实施例中,药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约85%或更高的纯度。在一些实施例中,药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约36个月或更久的约85%或更高的纯度(例如,如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约36个月或更久的85%或更高、约86%或更高、约87%或更高、约88%或更高、约89%或更高、约90%或更高、约91%或更高、约92%或更高、约93%或更高、约94%或更高、约95%或更高、约96%或更高、约97%或更高、约98%或更高、约99%或更高的纯度,例如,如通过非还原CE-SDS测定所评定的85%至90%、90%至95%、或95%至100%的纯度)。在一些实施例中,药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约42个月或更久的约85%或更高的纯度(例

如,如通过非还原CE-SDS测定所评定的在约5℃持续约42个月或更久的85％或更高、约86％或更高、约87％或更高、约88％或更高、约89％或更高、约90％或更高、约91％或更高、约92％或更高、约93％或更高、约94％或更高、约95％或更高、约96％或更高、约97％或更高、约98％或更高、约99％或更高的纯度,例如,如通过非还原CE-SDS测定所评定的85％至90％、90％至95％、或95％至100％的纯度)。

[0257] III.示例性治疗性蛋白质

[0258] 本公开的药物组合物中的治疗性蛋白质包括抗体,诸如双特异性抗体,例如T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)或T细胞接合双特异性抗体(TCB)。抗体或双特异性抗体可与CD3(例如,抗CD3抗体或抗CD3双特异性抗体)结合。TDB可具有抗CD3臂和抗靶标臂,该抗CD3臂具有与CD3结合的结合结构域,该抗靶标臂与靶标抗原结合。此类TDB的抗靶标臂可为例如抗CD20臂、抗FcRH5臂或抗HER2臂。TCB可具有至少一个CD3结合部分和至少一个靶标抗原结合部分。在一些实施例中,TCB具有一个CD3结合部分和两个靶标抗原结合部分。TCB的靶标抗原结合部分可为例如CD20。

[0259] 抗CD3双特异性抗体

[0260] 可用于本公开的方法中的抗CD3双特异性抗体包括PCT公开号WO 2015/095392中所述的任何抗CD3双特异性抗体(例如,TDB),该PCT全文通过引用以其整体并入本文。在一些实施例中,TDB具有抗CD3臂。在一些实施例中,抗CD3臂包括CD3结合结构域,该CD3结合结构域具有40G5c的一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或所有六个)高变区(HVR)氨基酸序列。例如,在一些实施例中,CD3结合结构域具有:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0261] 在一些实施例中,抗CD3抗体包含:分别包含SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:28的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:29至SEQ ID NO:32的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者)。在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95％序列同一性(例如,至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性、至少99％序列同一性或100％序列同一性)的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95％序列同一性(例如,至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性、至少99％序列同一性或100％序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在特定情况下,CD3结合结构域可具有40G5c或其衍生物或克隆亲属的氨基酸序列。40G5c的结构和功能特征描述于例如PCT公开号WO 2015/095392中,该PCT全文通过引用以其整体并入本文。

[0262] 在其他实施例中,抗CD3臂包括CD3结合结构域,该CD3结合结构域具有38E4v1的一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或所有六个)高变区(HVR)氨基酸序列。例如,在一些实施例中,CD3结合结构域具有:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;HVR-

L1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0263] 在一些实施例中,抗CD3抗体包含:分别包含SEQ ID NO:81至SEQ ID NO:84的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:85至SEQ ID NO:88的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者)。在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。在特定情况下,CD3结合结构域可具有38E4v1或其衍生物或克隆亲属的氨基酸序列。38E4v1的结构和功能特征描述于例如PCT公开号WO 2015/095392中,该PCT全文通过引用以其整体并入本文。

[0264] 可用于本公开的方法中的抗CD3双特异性抗体包括美国专利第9,914,776号中所述的任何抗CD3 T细胞活化双特异性抗原结合分子(例如,TCB,例如2+1TCB),该专利全文通过引用以其整体并入本文。在一些实施例中,抗CD3抗体包括CD3结合结构域,该CD3结合结构域具有以下高变区(HVR)中的一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或所有六个):HVR-H1,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。例如,在一些实施例中,CD3结合结构域具有:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3结合结构域包含:(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性)的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在某些实施例中,CD3结合结构域的VH结构域包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列且CD3结合结构域的VL结构域包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0265] 在某些实施例中,CD3结合结构域与由人类CD3ε的氨基酸1至26或1至27组成的CD3(例如,人类CD3ε)的片段内的表位结合。

[0266] 上述任何抗体(例如,TDB或TCB)的CD3结合结构域可结合特定CD3表位。例如,CD3结合结构域可以约3.5埃、约3.25埃、约3.0埃、约2.75埃或更小的距离与人类CD3ε的氨基酸接触。在某些实施例中,抗体以约3.5埃、约3.25埃、约3.0埃、约2.75埃或更小的距离与由人

类CD3ε的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸组成的表位结合。在一个实施例中,抗体以约3.5埃或更小的距离与人类CD3ε的氨基酸接触。在某些实施例中,抗体以约3.5埃或更小的距离与由人类CD3ε的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸组成的表位结合。例如,在某些实施例中,抗体与由人类CD3ε的氨基酸组成的表位(选自Gln1、Asp2、Asn4、Glu6和Met7)结合。在一个特定实施例中,CD3结合结构域与具体包括Glu6的表位结合。在某些其他实施例中,抗体不与包括人类CD3ε氨基酸Glu5的表位结合。在某些其他实施例中,抗体不与包括人类CD3ε氨基酸Gly3和Glu5的表位结合。

[0267] 可通过与表位的肽片段结合的抗CD3抗体来确定抗CD3表位。替代性地,可通过丙氨酸扫描诱变来确定抗CD3表位。在特定情况下,抗CD3抗体与突变的CD3的结合减少约20%、约30%、约50%、约80%或更多指示在丙氨酸扫描诱变测定中突变的CD3的氨基酸残基是对于该抗CD3抗体的表位残基。替代性地,可通过质谱法来确定抗CD3表位。在一些实施例中,通过晶体学来确定表位。

[0268] 在一些实施例中,使用CD3的氨基酸Q1至M7来确定通过晶体学确定的表位。

[0269] 在一些实施例中,通过晶体学确定的表位可通过将以10mg/ml溶解在0.15M NaCl、25mM tris(pH 7.5)中的抗CD3抗体Fab与2倍摩尔过量(1mg)的CD3ε肽组合,并最初以坐滴蒸气扩散形式筛选沉淀物的稀疏矩阵来进行。优化的晶体可从含有70%v/v甲基-戊二醇的储液池溶液与pH 7.5下的0.1M HEPES缓冲液的1:1混合物中生长出来。储液池可用作冷冻保护剂。晶体可以通过突然浸入液氮中而转移到低温温度。可在使用MAR300 CCD检测器的Advanced Photon Source光束线22ID(Argonne National Laboratory;Lemont,IL)处收集晶体的衍射数据。可使用程序HKL2000对所记录的衍射进行积分和缩放(Z.Otwinowski和W.Minor,“Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode”,Methods in Enzymology,第276卷:Macromolecular Crystallography,A区,第307-326页,1997,C.W.Carter,Jr.和R.M.Sweet编辑,Academic Press(New York))。

[0270] 可使用程序Phaser通过分子置换(MR)方法对结构定相(McCoy,A.等人Phaser crystallographic software.J Appl Crystallogr.2007年8月1日;40(Pt 4):658-674)。例如,MR搜索模型为衍生自HGFA/Fab复合体的晶体结构的Fab亚基(蛋白质数据库(PDB;Berman H.M.,Westbrook J.,Feng Z.,Gilliland G.,Bhat T.N.,Weissig H.,Shindyalov I.N.,Bourne P.E.(2,000)The Protein Data Bank.Nucleic Acids Res.28,235-242)编码:2ROL(Wu Y.,Eigenbrot C.,Liang W.-C.,Stawicki S.,Shia S.,Fan B.,Ganesan R.,Lipari M.T.,Kirchhofer D.(2007)Structural insight into distinct mechanisms of protease inhibition by antibodies.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104,19784-19789)。基于Fo-Fc图,将CD3ε肽构建到结构中。随后可以用程序REFMAC5(Murshudov GN,Vagin AA,Dodson EJ(1997)Acta Crystallogr D53:240-255)和PHENIX(D.Liebschner,P.V.Afonine,M.L.Baker,G.Bunkóczi,V.B.Chen,T.I.Croll,B.Hintze,L.-W.Hung,S.Jain,A.J.McCoy,N.W.Moriarty,R.D.Oeffner,B.K.Poon,M.G.Prisant,R.J.Read,J.S.Richardson,D.C.Richardson,M.D.Sammito,O.V.Sobolev,D.H.Stockwell,T.C.Terwilliger,A.G.Urzhumtsev,L.L.Videau,C.J.Williams和P.D.Adams.Macromolecular structure determination using X-rays,neutrons and electrons:recent developments in Phenix.Acta Cryst.(2019).D75,861-877),使用最

大似然目标函数、各向异性单个B因子细化方法和TLS(平移-振动-螺旋-旋转)细化方法,对结构进行细化,以实现收敛。

[0271] 在某些其他实施例中,药物组合物包括抗体,该抗体包括与上述抗CD3抗体结合至相同表位的互补位。

[0272] 抗CD20/抗CD3双特异性抗体

[0273] 在本公开的其中治疗性蛋白质为抗CD20/抗CD3双特异性抗体的实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体可单独地或组合地并入如本文所述的任何特征。

[0274] 莫苏尼妥珠单抗

[0275] 在一些实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TDB;例如,莫苏尼妥珠单抗)包含抗CD20臂和抗CD3臂。在一些实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体包括:(1)具有第一结合结构域的抗CD20臂,该第一结合结构域包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,这些HVR选自:(a)HVR-H1,其包含GYTFTSYNMH(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含AIYPGNGDTSYNQKFKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含VVYYSNSYWYFDV(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含RASSSVSYMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含APSNLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含QQWSFNPPT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;以及(2)具有第二结合结构域的抗CD3臂,该第二结合结构域包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,这些HVR选自:(a)HVR-H1,其包含NYYIH(SEQ ID NO:9)的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含WIYPGDGNTKYNEKFKG(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含DSYSNYYFDY(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含KSSQSLLNSRTRKNYLA(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含WASTRES(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含TQSFILRT(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。在一些情况下,莫苏尼妥珠单抗包含:(1)抗CD20臂,其分别包含SEQ ID NO:17至SEQ ID NO:20的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:21至SEQ ID NO:24的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者);和(2)抗CD3臂,其分别包含SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:28的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:29至SEQ ID NO:32的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者)。在一些情况下,莫苏尼妥珠单抗包含:(1)抗CD20臂,该抗CD20臂包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:7的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:8的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;和(2)抗CD3臂,该抗CD3臂包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:15的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:16的氨

基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,莫苏尼妥珠单抗包含:(1)抗CD20臂,该抗CD20臂包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,和(2)抗CD3臂,该抗CD3臂包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0276] 在一些情况下,莫苏尼妥珠单抗具有国际非专利药名(INN)清单117(WHO药品信息,第31卷,第2期,2017,第303页)或CAS注册号1905409-39-3,并且具有(1)抗CD20臂,其包含分别为SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的重链序列和轻链序列;以及(2)抗CD3臂,其包含分别为SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的重链和轻链序列。

[0277] 在一些情况下,莫苏尼妥珠单抗包含:(1)抗CD20臂,该抗CD20臂包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含:(a)重链,其包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:33的氨基酸序列;(b)轻链,其包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:34的氨基酸序列;或(c)如(a)中的重链和如(b)中的轻链;和(2)抗CD3臂,该抗CD3臂包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含:(a)重链,其包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:35的氨基酸序列;(b)轻链,其包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:36的氨基酸序列;或(c)如(a)中的重链和如(b)中的轻链。在一些情况下,莫苏尼妥珠单抗包含(1)抗CD20臂,该抗CD20臂包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含重链,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,和轻链,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,和(2)抗CD3臂,该抗CD3臂包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含重链,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和轻链,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0278] 下表1中汇总了莫苏尼妥珠单抗的氨基酸序列。

[0279] 表1.莫苏尼妥珠单抗的序列ID

[0280]

CD3 臂	CD20 臂

[0281]

SEQ ID NO:	说明	SEQ ID NO:	说明
9	CD3 HVR-H1	1	CD20 HVR-H1
10	CD3 HVR-H2	2	CD20 HVR-H2
11	CD3 HVR-H3	3	CD20 HVR-H3
12	CD3 HVR-L1	4	CD20 HVR-L1
13	CD3 HVR-L2	5	CD20 HVR-L2
14	CD3 HVR-L3	6	CD20 HVR-L3
15	CD3 VH	7	CD20 VH
16	CD3 VL	8	CD20 VL
35	CD3 重链	33	CD20 重链
36	CD3 轻链	34	CD20 轻链

[0282] 可使用重组方法和组合物来生产莫苏尼妥珠单抗,例如美国专利第4,816,567号中所述。

[0283] 格菲妥单抗

[0284] 在一些其他实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含:至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含重链可变区,该重链可变区包含:HVR-H1,其包含YSWIN(SEQ ID NO:37)的氨基酸序列;HVR-H2,其包含RIFPGDGDTDYNGKFKG(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列;和HVR-H3,其包含NVFDGYWLVY(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列;和轻链可变区,该轻链可变区包含:HVR-L1,其包含RSSKSLLHSNGITYLY(SEQ ID NO:40)的氨基酸序列;HVR-L2,其包含QMSNLVS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含AQNLELPYT(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列;以及至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含重链可变区,该重链可变区包含:HVR-H1,其包含TYAMN(SEQ ID NO:45)的氨基酸序列;HVR-H2,包含RIRSKYNNYATYYADSVKG的氨基酸序列(SEQ ID NO:46);和HVR-H3,其包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:47)的氨基酸序列;和轻链可变区,该轻链可变区包含:HVR-L1,其包含GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:48)的氨基酸序列;HVR-L2,其包含GTNKRAP(SEQ ID NO:49)的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含ALWYSNLWV(SEQ ID NO:50)的氨基酸序列。

[0285] 在一些实例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含:至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含VH结构域,该VH结构域包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:43的氨基酸序列;和VL结构域,该VL结构域包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:44的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;以及至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含VH结构域,该VH结构域包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:51的氨基酸序列;和VL结构域,该VL结构域包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一

性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0286] 在一个实施例中,与抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)的CD3特异性结合的抗原结合结构域为抗体片段,特别地为Fab分子或scFv分子,更特别地为Fab分子。在特定实施例中,与抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3TCB,例如格菲妥单抗)的CD3特异性结合的抗原结合结构域为交叉Fab分子,其中Fab重链和Fab轻链的可变结构域或恒定结构域被交换(即彼此替换)。

[0287] 在一个实施例中,与抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)的CD20特异性结合的抗原结合结构域为抗体片段,特别地为Fab分子或scFv分子,更特别地为Fab分子。在特定实施例中,与抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3TCB,例如格菲妥单抗)的CD20特异性结合的抗原结合结构域为常规Fab分子。

[0288] 在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域和一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域。在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含与CD3特异性结合的第一抗原结合结构域以及与CD20特异性结合的第二和第三抗原结合结构域。在一个实施例中,第一抗原结合结构域为交叉Fab分子,而第二和第三抗原结合结构域各自为常规Fab分子。在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)进一步包含Fc结构域。抗CD20/抗CD3双特异性抗体可在Fc区和/或如本文所述的抗原结合结构域中包含修饰。在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3TCB,例如格菲妥单抗)包含IgG1 Fc结构域,该IgG1 Fc结构域包含降低与Fc受体的结合和/或效应子功能的一种或多种氨基酸取代。在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含IgG1 Fc结构域,该IgG1 Fc结构域包含氨基酸取代L234A、L235A和P329G(EU编号)。

[0289] 在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含:与CD3特异性结合的抗原结合结构域,其在Fab重链的C末端处与Fc结构域的第一亚基的N末端融合;与CD20特异性结合的第一抗原结合结构域,其在Fab重链的C末端处与CD3特异性结合的抗原结合结构域的Fc重链的N末端融合;以及与CD20特异性结合的第二抗原结合结构域,其在Fab重链的C末端处与Fc结构域的第二亚基的N末端融合。

[0290] 在特定实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含:(a)第一Fab分子,其与CD3、特别是与CD3ε特异性结合;并且其中Fab轻链和Fab重链的可变结构域VL和VH彼此替换;(b)第二Fab和第三Fab分子,其与CD20特异性结合,其中在第二Fab和第三Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号),并且位置123处的氨基酸被赖氨酸(K)或精氨酸(R)(特别是精氨酸(R))取代(根据Kabat编号),并且其中在第二Fab和第三Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号),并且位置213处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号);以及(c)由能够稳定缔合的第一亚基和第二亚基构成的Fc结构域。

[0291] 在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格菲妥单抗)包含两个与CD20特异性结合的抗原结合结构域以及一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域。

[0292] 在一个实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB,例如格

菲妥单抗)对于CD20是双价的且对于CD3是单价的。

[0293] 在一个实施例中,第一Fab分子(即,其结合CD3)在Fab重链的C末端处与Fc结构域的亚基中的一者的N末端融合,第二Fab分子(即,其结合CD20)在Fab重链的C末端处与第一Fab分子的重链的N末端融合,并且第三Fab分子(即,其结合CD20)在Fab重链的C末端处与Fc结构域的另一亚基的N末端融合。在一个实施例中,第一Fab分子包含:VH结构域,其与SEQ ID NO:51的序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同;和VL结构域,其与SEQ ID NO:52的序列至少约95%、96%、97%、98%或99%相同。在一些实施例中,第一Fab分子包含:重链可变区序列,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0294] 在一个实施例中,第二Fab分子和第三Fab分子各自包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区与SEQ ID NO:43的序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同,并且该轻链可变区与SEQ ID NO:44的序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0295] 在一个实施例中,第二Fab分子和第三Fab分子各自包含SEQ ID NO:43的重链可变区序列和SEQ ID NO:44的轻链可变区序列。

[0296] 在特定实施例中,抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TCB;例如,格菲妥单抗)包含:与SEQ ID NO:53的序列为至少95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽;与SEQ ID NO:54的序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽;与SEQ ID NO:55的序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽;以及与SEQ ID NO:56的序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽。在又一特定实施例中,双特异性抗体包含SEQ ID NO:53的多肽序列、SEQ ID NO:54的多肽序列、SEQ ID NO:55的多肽序列和SEQ ID NO:56的多肽序列。在又一特定实施例中,双特异性抗体包含:一条多肽链,该多肽链包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列;一条多肽链,该多肽链包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;一条多肽链,该多肽链包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列;和两条多肽链,该多肽链各自包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列。

[0297] 特定的抗CD20/抗CD3双特异性抗体描述于PCT公开号WO 2016/020309和欧洲专利申请号EP15188093和EP16169160(各自通过引用整体并入本文)。

[0298] 格菲妥单抗的序列汇总于表2中。

[0299] 表2.格菲妥单抗的序列ID

[0300]

格菲妥单抗的序列 ID			
CD3 重链		CD3 轻链	
SEQ ID NO:	说明	SEQ ID NO:	说明
45	HVR-H1 (Kabat)	48	HVR-L1 (Kabat)
46	HVR-H2 (Kabat)	49	HVR-L2 (Kabat)
47	HVR-H3 (Kabat)	50	HVR-L3 (Kabat)
51	VH	52	VL
CD20 重链		CD20 轻链	
37	HVR-H1 (Kabat)	40	HVR-L1 (Kabat)
38	HVR-H2 (Kabat)	41	HVR-L2 (Kabat)
39	HVR-H3 (Kabat)	42	HVR-L3 (Kabat)
43	VH	44	VH
全长抗体			
53	HC-杵	54	HC-臼
56	LC-CD3	55	LC-CD20

[0301] 在一个实施例中,本公开的药物组合物的抗CD20/抗CD3双特异性抗体为格菲妥单抗。

[0302] 抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体

[0303] 在本公开的其中治疗性蛋白质为抗FcRH5/抗CD30双特异性抗体的实施例中,抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体可单独地或组合地并入如本文所述的任何特征。

[0304] 西沃司他单抗

[0305] 在一些实施例中,抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体(例如,抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)包含抗FcRH5臂和抗CD3臂。在一些实施例中,抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体包括:(1)具有第一结合结构域的抗FcRH5臂,该第一结合结构域包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,这些HVR选自:(a)HVR-H1,其包含RFGVH(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含VIWRGGSTDYNAAFVS(SEQ ID NO:58)的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含HYYGSSDYALDN(SEQ ID NO:59)的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含KASQDVRNLVV(SEQ ID NO:60)的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SGSYRYS(SEQ ID NO:61)的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含QQHYSPPYT(SEQ ID NO:62)的氨基酸序列;和(2)具有第二结合结构域的抗CD3臂,该第二结合结构域包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,这些HVR选自:(a)HVR-H1,其包含SYYIH(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含WIYPENDNTKYNEKFKD(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含DGYSRYYFDY(SEQ ID NO:67)的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含KSSQSLLNSRTRKNYLA(SEQ ID NO:68)的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含WTSTRKS(SEQ ID NO:69)的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含KQSFILRT(SEQ ID NO:70)的氨基酸序列。在一些情况下,西沃司他单抗包含:(1)抗FcRH5臂,其分别包含SEQ ID NO:73至SEQ ID NO:76的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:77至SEQ ID NO:80的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者);和(2)抗CD3臂,其分别包含SEQ ID NO:81至SEQ ID NO:84的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和

FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:85至SEQ ID NO:88的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者)。在一些情况下,西沃司他单抗包含:(1)抗FcRH5臂,其包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:63的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:64的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;和(2)抗CD3臂,其包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:71的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:72的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,西沃司他单抗包含:(1)抗FcRH5臂,该抗FcRH5臂包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VH结构域和含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL结构域,和(2)抗CD3臂,该抗CD3臂包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VH结构域和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL结构域。

[0306] 在一些情况下,西沃司他单抗描述于WHO Drug Information(国际非专利药名),推荐INN:清单84,第34卷,第3期,2020年出版(见第701页),具有CAS注册号1905409-39-3,并且具有(1)抗FcRH5臂,其包含分别为SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的重链序列和轻链序列;和(2)抗CD3臂,其包含分别为SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92的重链和轻链序列。

[0307] 在一些情况下,西沃司他单抗包含:(1)抗FcRH5臂,其包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含:(a)重链,其包含与SEQ ID NO:89的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:89的氨基酸序列;(b)轻链,其包含与SEQ ID NO:90的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:90的氨基酸序列;或(c)如(a)中的重链和如(b)中的轻链;和(2)抗CD3臂,其包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含:(a)重链,其包含与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:91的氨基酸序列;(b)轻链,其包含与SEQ ID NO:92的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:92的氨基酸序列;或(c)如(a)中的重链和如(b)中的轻链。在一些情况下,西沃司他单抗包含:(1)抗FcRH5臂,其包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链,和(2)抗CD3臂,其包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含含有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的轻链。

[0308] 西沃司他单抗的氨基酸序列汇总于下表3中。

[0309] 表3.西沃司他单抗的序列ID

[0310]

CD3臂		FcRH5臂	
SEQ ID NO:	说明	SEQ ID NO:	说明
65	CD3 HVR-H1	57	FcRH5 HVR-H1
66	CD3 HVR-H2	58	FcRH5 HVR-H2
67	CD3 HVR-H3	59	FcRH5 HVR-H3
68	CD3 HVR-L1	60	FcRH5 HVR-L1
69	CD3 HVR-L2	61	FcRH5 HVR-L2
70	CD3 HVR-L3	62	FcRH5 HVR-L3
71	CD3 VH	63	FcRH5 VH
72	CD3 VL	64	FcRH5 VL
91	CD3 重链	89	FcRH5 重链
92	CD3 轻链	90	FcRH5 轻链

[0311] 可使用重组方法和组合物来生产西沃司他单抗,例如美国专利第4,816,567号中所述。

[0312] 抗HER2/抗CD3双特异性抗体

[0313] 在本公开的其中治疗性蛋白质为抗HER2/抗CD3双特异性抗体的实施例中,抗HER2/抗CD3双特异性抗体可单独地或组合地并入如本文所述的任何特征。

[0314] 芦莫妥单抗

[0315] 在一些实施例中,抗HER2/抗CD3双特异性抗体(例如,抗HER2/抗CD3 TDB;例如,芦莫妥单抗)包含抗HER2臂和抗CD3臂。在一些实施例中,抗HER2/抗CD3双特异性抗体包括:(1)具有第一结合结构域的抗HER2臂,该第一结合结构域包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,这些HVR选自:(a)HVR-H1,其包含DTYIH(SEQ ID NO:93)的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含RIYPTNGYTRYADSVKG(SEQ ID NO:94)的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含WGGDGFYAMDY(SEQ ID NO:95)的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含RASQDVNTAVA(SEQ ID NO:96)的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SASFLYS(SEQ ID NO:97)的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含QQHYTTPPT(SEQ ID NO:98)的氨基酸序列;和(2)具有第二结合结构域的抗CD3臂,该第二结合结构域包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,这些HVR选自:(a)HVR-H1,其包含NYYIH(SEQ ID NO:109)的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含WIYPGDGNTKYNEKFKG(SEQ ID NO:110)的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含DSYSNYYFDY(SEQ ID NO:111)的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含KSSQSLLNSRTRKNYLA(SEQ ID NO:112)的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含WASTRES(SEQ ID NO:113)的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含TQSFILRT(SEQ ID NO:114)的氨基酸序列。在一些情况下,芦莫妥单抗包含:(1)抗HER2臂,其分别包含SEQ ID NO:101至SEQ ID NO:104的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:105至SEQ ID NO:108的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者);和(2)抗CD3臂,其分别包含SEQ ID NO:117至SEQ ID NO:120的序列的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4中的至少一者(例如1、2、3或4者),和/或分别包含SEQ ID NO:121至SEQ ID NO:124的序列的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4中的至少一者(例如1、2、3或4者)。在

一些情况下,芦莫妥单抗包含:(1)抗HER2臂,其包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:99的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:100的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;和(2)抗CD3臂,其包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:115的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:116的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:116的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,芦莫妥单抗包含(1)抗HER2臂,其包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的VH结构域和含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的VL结构域,和(2)抗CD3臂,其包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含含有SEQ ID NO:115的氨基酸序列的VH结构域和含有SEQ ID NO:116的氨基酸序列的VL结构域。

[0316] 在一些情况下,莫苏尼妥珠单抗具有国际非专利药名(INN)清单124(WHO Drug Information,第34卷,第4期,2020,第1031页)或CAS注册号2361325-98-4,并且具有(1)抗HER2臂,其包含分别为SEQ ID NO:125和SEQ ID NO:126的重链和轻链序列;和(2)抗CD3臂,其包含分别为SEQ ID NO:128和SEQ ID NO:127的重链和轻链序列。

[0317] 在一些情况下,芦莫妥单抗包含:(1)抗HER2臂,其包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含:(a)重链,其包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:125的氨基酸序列;(b)轻链,其包含与SEQ ID NO:126的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:126的氨基酸序列;或(c)如(a)中的重链和如(b)中的轻链;和(2)抗CD3臂,其包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含:(a)重链,其包含与SEQ ID NO:127的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:127的氨基酸序列;(b)轻链,其包含与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或SEQ ID NO:128的氨基酸序列;或(c)如(a)中的重链和如(b)中的轻链。在一些情况下,芦莫妥单抗包含:(1)抗HER2臂,其包含第一结合结构域,该第一结合结构域包含含有SEQ ID NO:125的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:126的氨基酸序列的轻链,和(2)抗CD3臂,其包含第二结合结构域,该第二结合结构域包含含有SEQ ID NO:127的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:128的氨基酸序列的轻链。

[0318] 芦莫妥单抗的氨基酸序列汇总于下表4中。

[0319] 表4.芦莫妥单抗的序列ID

[0320]

CD3 臂		HER2 臂	
SEQ ID NO:	说明	SEQ ID NO:	说明
109	CD3 HVR-H1	93	HER2 HVR-H1
110	CD3 HVR-H2	94	HER2 HVR-H2
111	CD3 HVR-H3	95	HER2 HVR-H3
112	CD3 HVR-L1	96	HER2 HVR-L1
113	CD3 HVR-L2	97	HER2 HVR-L2
114	CD3 HVR-L3	98	HER2 HVR-L3
115	CD3 VH	99	HER2 VH
116	CD3 VL	100	HER2 VL
127	CD3 重链	125	HER2 重链
128	CD3 轻链	126	HER2 轻链

[0321] 可使用重组方法和组合物来生产芦莫妥单抗,例如美国专利第4,816,567号中所述。

[0322] IV.抗体特性、修饰和表征方法

[0323] 本文所提供的药物组合物可进一步包括本文所述的任何抗体,其中该抗体包含如上文所提供的任何实施例中的VH以及如上文所提供的任何实施例中的VL,其中恒定结构域序列中的一者或两者均包括翻译后修饰。另外地或替代性地,根据任何上述实施例的抗体(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB)可单独地或组合地并入如下所述的任何特征。

[0324] 1.抗体亲和力

[0325] 在某些实施例中,本文提供的药物组合物和方法的抗体具有例如相对于抗CD3臂或抗靶标臂(例如,抗CD20臂、抗FcRH5臂或抗HER2臂)的≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(K_D)。

[0326] 在一个实施例中,通过放射性标记的抗原结合测定法(RIA)测量K_D。在一个实施例中,用目标抗体的Fab形式及其抗原执行RIA。例如,通过在连续系列未标记的抗原存在下用最小浓度的(^{125}I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原,来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见例如Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了确定用于测定的条件,用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中5μg/ml捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)包被MICROTITER®微孔板(Thermo Scientific)过夜,随后在室温(大约23℃)下用在PBS中2%(w/v)牛血清白蛋白阻断二至五小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM[^{125}I]-抗原与目的Fab的连续稀释液(例如,遵循在Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中抗VEGF抗体(Fab-12)的评定)混合。然后将目的Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续更长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以在室温下孵育(例如,一小时)。然后去除溶液,并用在PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN®20)将板洗涤八次。当板已干燥时,添加150μL/孔的闪烁剂(MICROSCINT-20™;Packard),并且在TOPCOUNT™ γ计数器(Packard)上对板计数十分钟。选择给出小于或等于20%最大结合的各Fab的浓度以用于竞争性结合测定中。

[0327] 根据另一实施例,使用BIACORE®表面等离子体共振测定测量K_D。例如,使用

BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(BIACORE®,Inc.,Piscataway,NJ)的测定,是以固定的抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)在25℃下进行。在一个实施例中,根据供应商说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIACORE®,Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠(pH 4.8)稀释至5μg/ml(约0.2μM),之后以5μL/分钟的流速进行注射以获得大约10响应单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原之后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,将Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)在25℃以约25μl/min的流速注入含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN®20)表面活性剂(PBST)的PBS中。使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE®Evaluation Software 3.2版),通过同时拟合缔合与解离感测器图来计算缔合速率(k_{on})与解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_D)计算为比率k_{off}/k_{on}。参见例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过上述表面等离子体共振测定测得的缔合速率(on-rate)超过$10^6 M^{-1}s^{-1}$,则可以通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率,该技术可测量25℃PBS(pH 7.2)中的20nM抗原抗体(Fab形式)在存在浓度升高的抗原的情况下荧光发射强度的增加或减少(激发波长=295nm;发射波长=340nm,带通16nm),该抗原浓度可通过分光光度计诸如止流分光光度计(Aviv Instruments)或带有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)测得。

[0328] 2.抗体片段

[0329] 在某些实施例中,治疗性蛋白质为抗体片段,例如与CD3和CD20结合的抗体片段。抗体片段包括Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fv和scFv片段以及下文所述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthün在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994)中所述;还可参见WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。关于对包含补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和$F(ab')_2$片段的讨论,请参见美国专利号5,869,046。

[0330] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三抗体和四抗体也在Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)中进行了描述。

[0331] 单结构域抗体为包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施例中,单结构域抗体为人类单结构域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见例如,美国专利第6,248,516号)。

[0332] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述。

[0333] 3.嵌合和人源化抗体

[0334] 在某些实施例中,治疗性蛋白质为嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如,美国专利号4,816,567和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体为其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的"类别转换"抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0335] 在某些实施例中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)源自非人抗体,而FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源于的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0336] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且进一步描述于例如:Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号和第7,087,409号;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述了特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了"表面再塑");Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述了"FR改组");Osbourn等人,Methods 36:61-68(2005);和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了FR改组的"指导选择"法)。

[0337] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用"最佳匹配"方法选择的框架区(参见例如,Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993));来源于轻链或重链可变区的特定亚组的人类抗体的共有序列的框架区(参见例如,Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等人,J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟的(体细胞突变)框架区或人类种系框架区(参见例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));以及来源于筛选FR文库的框架区(参见例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997);和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0338] 4.杵臼抗体工程改造

[0339] 抗体(例如双特异性抗体,例如TDB或TCB)可以制备为全长抗体或抗体片段。制备双特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见Milstein等人,Nature 305:537(1983));WO 93/08829;和Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991))和"杵臼"工程改造(参见例如,美国专利第5,731,168号)。双特异性抗体的"杵臼"工程改造可用于生成含有杵的Fc结构域的第一亚基(例如,第一臂的Fc结构域的亚基)和含有第一臂的杵可以结合到其中的臼的Fc结构域的第二亚基(例如,第二臂的Fc结构域的亚基)。在一个实施例中,双特异性抗体的杵可以在Fc结构域的一个亚基(例如,抗CD3臂的Fc亚基)上。替代性地,本公开的双特异性抗体的杵可以在Fc结构域的另一亚基(例如,抗靶标臂的Fc亚基;例如,抗CD20、抗FcRH5或抗HER2臂的Fc亚基)上。在一个实施例中,本公开的双特异性抗体的臼可以在抗CD3臂上。替代性地,本公开的双特异性抗体的臼可以在抗靶标臂(例如,抗CD20、抗FcRH5或抗HER2臂)上。在一些情况下,使用杵臼技术生产的抗CD20/抗CD3双特异性抗体可包含一个或多个重链恒定结构域,其中该一个或多个重链恒定结构域选自:第一CH1($CH1_1$)结构域、第一CH2($CH2_1$)结构域、第一CH3($CH3_1$)结构域、第二CH1($CH1_2$)结构域、第二CH2($CH2_2$)结构域和第二CH3($CH3_2$)结构域。在一些情况下,一个(种)或多个(种)重链恒定结构域中的至少一个与另一个重链恒定结构域配对。在一些情况下,$CH3_1$和$CH3_2$结构域各自包含突起或空腔,并且其中$CH3_1$结构域中的突起或空腔分别可定位在$CH3_2$结构域中的空腔或突起中。在一些情况下,$CH3_1$和$CH3_2$结构域在介于突起与空腔之

间的界面处相遇。在一些情况下,$CH2_1$和$CH2_2$结构域各自包含突起或空腔,并且其中$CH2_1$结构域中的突起或空腔分别可定位在$CH2_2$结构域中的空腔或突起中。在一些情况下,$CH2_1$和$CH2_2$结构域在介于所述突起与空腔之间的界面处相遇。

[0340] 双特异性抗体还可使用免疫球蛋白交叉(也称为Fab结构域交换或CrossMab形式)技术进行工程化改造(参见例如,WO 2009/080253;Schaefer等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,108:11187-11192(2011))。双特异性抗体也可通过以下方法进行制备:用于制备抗体Fc-异二聚体分子的工程静电操纵效应(WO 2009/089004);交联两个或更多个抗体或片段(参见例如,美国专利第4,676,980号;和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用"双抗体"技术以用于制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(scFv)二聚体(参见例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及按照例如Tutt等人J.Immunol.147:60(1991)所述的方法制备三特异性抗体。

[0341] 双特异性抗体或其抗体片段还可包括"双重作用Fab"或"DAF"(参见例如,美国公开号2008/0069820;Bostrom等人,2009,Science323:1610-14),其包含与CD3以及靶标抗原(诸如CD20、FcRH5或HER2)结合的抗原结合位点。

[0342] 5.抗体变体

[0343] 在一些情况下,考虑到上述抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,前提条件为最终构建体具有所需特征,例如,抗原结合。

[0344] (i)取代、插入和删除性变体

[0345] 在某些实施例中,提供了具有一或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代性诱变的目的位点包括HVR和框架区(FR)。保守置换在表5中的"优选置换"标题下示出。更多实质性改变提供于表5的"示例性置换"标题下,并且在下文参考氨基酸侧链类别进行了进一步描述。可以将氨基酸取代引入目的抗体中,并且对产物进行所需活性(例如,保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC)筛选。

[0346] 表5.示例性和优选的氨基酸取代

[0347]

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu；Val；Met；Ala；Phe；正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸；Ile；Val；Met；Ala；Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

[0348]

原始残基	示例性取代	优选的取代
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile；Leu；Met；Phe；Ala；正亮氨酸	Leu

[0349] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组：

[0350] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0351] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0352] (3)酸性:Asp、Glu;

[0353] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0354] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0355] (6)芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0356] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[0357] 一种类型的取代变体涉及取代一个或多个亲本抗体(例如,人源化或人类抗体)的高变区(HVR)残基。通常,相对于亲本抗体,选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将

在某些生物学特性方面(例如,亲和力增加、免疫原性降低)有改变(例如,改善)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体为亲和力成熟抗体,其可以例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简而言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并且针对特定生物活性(例如,结合亲和力)进行筛选。

[0358] 例如,可改变(例如,取代)HVR,以改善抗体亲和力。可以在HVR“热点”中进行此类改变,即由密码子编码的残基在体细胞成熟过程期间经历高频突变(参见例如,Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或与抗原接触的残基,并测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建并自二级文库重新选择而实现的亲和力成熟已被例如Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,Totowa,NJ,(2001))中进行描述。在亲和力成熟的一些实施例中,利用多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定点诱变基因)中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。随后对该文库进行筛选以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中将若干HVR残基(例如,每次4至6个残基)随机化。参与抗原结合的HVR残基可例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定。特别地,常常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0359] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体的抗原结合能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文所提供的保守性取代)。此类改变可以在HVR的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施例中,每个HVR保持不变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0360] 如Cunningham和Wells(1989)(Science,244:1081-1085)所述,可用于鉴定可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中,鉴别残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。可替代地或另外地,利用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴别抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0361] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽的抗体的N末端或C末端的融合。

[0362] (ii)糖基化变体

[0363] 在一些情况下,本文提供的药物组合物的抗体已被修饰以增加或减少抗体被糖基化的程度。糖基化位点向抗体的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0364] 当抗体包含Fc区时,附接于其上的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支链的双触角寡糖,该双触角寡糖通常通过N-键合连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水

化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可对本公开的抗体中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0365] 在一些情况下,药物组合物的抗体具有碳水化合物结构,该碳水化合物结构缺乏(直接或间接地)连接至Fc区的岩藻糖。例如,此类抗体中的岩藻糖的量可为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过计算Asn297糖链中岩藻糖的平均量来测定岩藻糖相对于通过MALDI-TOF质谱测得的连接至Asn297的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和的量,例如,WO 2008/077546中所公开。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于297位上游或下游大约±3个氨基酸,即在294位和300位之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如,美国专利公开号US2003/0157108(Presta,L.);US2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体相关的出版物示例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US2003/0115614;US 2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的示例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利公开号US2003/0157108,Presta,L;和PCT公开号WO 2004/056312,Adams等人,尤其是在实例11中);和敲除细胞系,诸如敲除α-1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8的CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO 2003/085107)。

[0366] 鉴于上述,在一些情况下,可用于本公开的抗体包括去糖基化位点突变。在一些情况下,去糖基化位点突变降低了双特异性抗体的效应子功能。在一些情况下,去糖基化突变是一种取代突变。在一些情况下,双特异性抗体包含在Fc区的取代突变,其降低了效应子功能。在一些情况下,取代突变在氨基酸残基N297、L234、L235、D265和/或P329(EU编号)处。在一些情况下,取代突变选自由以下项组成的组:N297G、N297A、L234A、L235A、D265A和P329G。在一些情况下,取代突变在氨基酸残基N297处。在一个优选实施例中,取代突变为N297A。

[0367] 在其他情况下,根据本公开的方法使用具有两分型寡糖的抗体变体,例如,其中附接至抗体的Fc区的双角寡糖被GlcNAc两分。此类抗体变体可具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的示例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利第6,602,684号(Umana等人);和US2005/0123546(Umana等人)中。还提供了在连接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);以及WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0368] (iii)Fc区变体

[0369] 在一些情况下,具有一个或多个引入抗体(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB)的Fc区的氨基酸修饰的抗体变体(即,Fc区变体(参见例如,U.S.2012/0251531))可根据本公开的方法向患有癌症(例如,B细胞增殖性疾患)的受试者施用。Fc区变体可包含人Fc区序列

(例如人IgG_1、IgG_2、IgG_3或IgG_4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0370] 在一些情况下,双特异性Fc区抗体变体具有一些但不是全部效应子功能,这使其成为应用(其中抗体的体内半衰期很重要而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要或有害的)的理想候选物。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fcγ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fcγ RIII,而单核细胞表达Fcγ RI、Fcγ RII和Fcγ RIII。FcR在造血细胞上的表达汇总于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页的表3中。用于评定目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性示例描述于美国专利第5,500,362号中(参见例如,Hellstrom,I.等人Proc.Natl Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人Proc.Natl Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。替代性地,可采用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(PROMEGA®,Madison,WI))。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代性地或另外地,可在例如Clynes等人在Proc.Natl Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中在体内评定目的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评定补体活化,可以执行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人Blood.101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie Blood.103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除率/半衰期测定也可使用本领域中已知的方法进行(参见例如,Petkova,S.B.等人Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0371] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329的取代的那些(美国专利号6,737,056和8,219,149)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处具有取代的Fc突变体,包括所谓的"DANA"Fc突变体,其中残基265和297被丙氨酸取代(美国专利第7,332,581号和第8,219,149号)。

[0372] 在某些情况下,抗体中野生型人Fc区的位置329处的脯氨酸被甘氨酸或精氨酸或氨基酸残基取代,足以破坏脯氨酸在Fc/Fcγ受体界面内的脯氨酸夹心,该界面形成于Fc的脯氨酸329和Fcγ RIII的色氨酸残基Trp 87和Trp 110之间(Sondermann等人Nature.406,267-273(2000))。在某些实施例中,双特异性抗体包含至少一个另外的氨基酸取代。在另一个实施例中,该另外的氨基酸取代为S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S,并且在又一个实施例中,该至少一个另外的氨基酸取代为人IgG1 Fc区的L234A和L235A或人IgG4 Fc区的S228P和L235E(参见例如US2012/0251531),并且在又一个实施例中,该至少一个另外的氨基酸取代为人IgG1 Fc区的L234A和L235A以及P329G。

[0373] 描述了具有改善的或降低的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如,美国专利第6,737,056号;WO 2004/056312;和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。)

[0374] 在某些情况下,治疗性蛋白质为具有包含一个或多个氨基酸取代的Fc区的抗体,

这些取代改善了ADCC,例如Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的取代。

[0375] 在一些情况下,在Fc区中进行改变,导致改变(即,改善或减少)的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,美国专利第6,194,551号、WO 99/51642和Idusogie等人J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0376] 具有更长半衰期并改善了与新生儿Fc受体(FcRn)(其负责将母体IgG转移给胎儿)(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))的结合的抗体描述于US2005/0014934(Hinton等人)中。那些抗体包含Fc区,该Fc区中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。

[0377] 有关Fc区变体的其他实例,另外参见:Duncan和Winter,Nature322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;以及WO 94/29351。

[0378] (iv)经半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0379] 在某些实施例中,可期望产生经半胱氨酸工程化改造的抗体,例如“thioMAbs”,其中双特异性抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施例中,取代的残基存在于抗体的可接近位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位于双特异性抗体的可接近位点,并且可用于将抗体与其他部分(诸如药物部分或连接基-药物部分)缀合,以产生免疫缀合物。在某些实施例中,可用半胱氨酸取代下列残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可例如美国专利号7,521,541中所述生成半胱氨酸工程化改造的抗体。

[0380] 因此,明确考虑与一种或多种毒性剂缀合的抗体的免疫缀合物,该一种或多种毒性剂为诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,来源于细菌、真菌、植物或动物的蛋白质毒素、酶活性毒素或其片段)或放射性同位素。

[0381] 在一些情况下,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中双特异性抗体与一种或多种药物缀合,该药物包括但不限于美登木素生物类(参见美国专利第5,208,020号和第5,416,064号和欧洲专利EP 0 425 235 B1);澳瑞他汀诸如单甲基澳瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利第5,635,483号、第5,780,588号和第7,498,298号);多拉司他汀;卡奇霉素或其衍生物(参见美国专利第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号和第5,877,296号;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类药物,诸如柔红霉素或多柔比星(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利第6,630,579号);甲氨蝶呤;长春地碱;紫杉烷,诸如多西他赛、紫杉醇、拉罗他赛、替塞他赛和奥他他赛;单端孢菌素;和CC1065。

[0382] 在一些情况下,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的抗体(例如,双特异性抗体),该酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来源于铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A

链、蒴莲根毒素A链、α-八迭球菌、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹黄素蛋白、美洲商陆抗病毒(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(Momordica charantia)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂、多花白树毒蛋白(gelonin)、米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯。

[0383] 在另一实施例中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的抗体(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB)。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合物。示例包括^{211}AT、^{131}I、^{125}I、^{90}Y、^{186}Re、^{188}Re、^{153}Sm、^{212}Bi、^{32}P、^{212}Pb和Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,它可能包含用于闪烁显像研究的放射性原子,例如^{99m}Tc或^{123}I,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记物,诸如^{123}I、^{131}I、^{111}In、^{19}F、^{13}C、^{15}N、^{17}O、钆、锰或铁。

[0384] 抗体(例如,双特异性抗体,例如TDB或TCB)与细胞毒性剂的缀合物可使用多种双功能蛋白偶联剂进行制备,该双功能蛋白偶联剂为诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨基酯的双官能衍生物(诸如己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。^{14}C标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)为示例性螯合剂,用于将放射性核苷酸与抗体缀合。参见WO 94/11026。连接基可以为促进细胞中细胞毒性药物释放的“可切割连接基”。例如,可使用酸不稳定的接头、对肽酶敏感的接头、对光不稳定的接头、二甲基接头或含二硫键的接头(Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利第5,208,020号)。

[0385] 本文的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于此类用交联剂制备的缀合物,该交联剂包括但不限于可商购获得(例如从Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL.,U.S.A.商购获得)的BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB以及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)。

[0386] (v)其他抗体衍生物

[0387] 在一些情况下,治疗性蛋白质可为以下抗体,其已被修饰以含有本领域中已知且易于获得并根据本文所述的方法向受试者施用的额外非蛋白质部分。适合于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性示例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯啶酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)以及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯啶酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在制造中可具有优势。该聚合物可具有任何分子量,并且可具有支链或不具有支链。连接至抗体的聚合物的数目可变化,并且如果连接了多于一个聚合物,那么它们可以为相同或不同的分子。通常,可基于以下考虑因素测定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,

包括但不限于抗体待改善的特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定条件下的疗法等。

[0388] 在一些情况下,提供了抗体和可通过暴露于辐射而选择性地加热的非蛋白质性部分的缀合物。在一个实例中,非蛋白质性部分为碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可具有任何波长,并且包括但不限于对普通细胞没有伤害、但是将非蛋白质性部分加热至抗体-非蛋白质性部分近端的细胞被杀死的温度的波长。

[0389] V.重组方法和组合物

[0390] 可用于本文提供的药物组合物和方法中的治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)可使用重组方法和组合物(例如,如美国专利第4,816,567号中所述)进行生产。在一个实施例中,提供编码本文所述的治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的经分离的核酸。在其中治疗性蛋白质为抗体的实施例中,此类核酸可编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在进一步的实施例中,提供一或多个包含此类核酸的载体(例如,表达载体)。在进一步的实施例中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施例中,宿主细胞包含(例如,已经用以下各物转化):(1)载体,该载体包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸,或(2)第一载体,该第一载体包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列的核酸,和第二载体,该第二载体包含编码包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施例中,宿主细胞为真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如,Y0、NS0或Sp2/0细胞)。抗体可通过以下方法来制备:在适于抗体表达的条件下培养包含如上所提供的编码抗体的核酸的宿主细胞,并任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收该抗体。

[0391] 对于治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的重组生产,将编码治疗性蛋白质的核酸(例如,如上所述)分离并插入到一个或多个载体中以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序来容易地对此类核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0392] 用于克隆或表达编码治疗性蛋白质的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利第5,648,237号、第5,789,199号和第5,840,523号。还参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编辑,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其中描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达。在表达之后,抗体可与细菌细胞糊中的可溶性级分分离,并可经过进一步纯化。

[0393] 除了原核生物外,诸如丝状真菌或酵母等真核微生物也是用于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,该真核微生物包括这样的真菌和酵母菌株:其糖基化途径已经“人源化”,从而使得产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004)和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0394] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了许多可以与昆虫细胞一起使用的杆状病毒株,特别是用于转染草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0395] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如,美国专利第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号和第6,417,429号(描述了在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0396] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用哺乳动物宿主细胞系的其他示例为由SV40(COS-7)转化的猴肾CV1系;人胚肾系(如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述的293或293T细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利氏细胞(如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人类宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人类肺细胞(W138);人类肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述);MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));以及骨髓瘤细胞系诸如YO、NSO和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编辑,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0397] VI.测定

[0398] 可以通过本领域中已知和本文所述的各种测定来鉴定、筛选或表征本公开的药物组合物的治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的物理/化学特性和/或生物活性。

[0399] (i)结合测定

[0400] 在一方面,测试本公开的治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的抗原结合活性,例如,通过已知方法诸如ELISA、蛋白质印迹等来进行。

[0401] 例如,竞争测定可用于鉴定与本公开的抗体竞争结合其抗原的抗体。在一种被配置为表征与CD3的结合的示例性竞争测定中,将固定的CD3在包含与CD3结合的第一标记的抗体和正在测试其与第一抗原竞争与CD3结合的能力的第二未标记的抗体的溶液中孵育。该第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定化CD3在包含第一标记抗体而非包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在容许第一抗体与CD3结合的条件下温育之后,去除过量未结合的抗体,并且测量与固定化CD3缔合的标记的量。若与固定化CD3缔合的标记的量相对于对照样品在测试样品中基本上减少,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合CD3。参见,例如,Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual.Ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0402] (ii)活性测定

[0403] 在一个方面,提供用于鉴定其具有生物活性的抗体的测定。生物活性可包括例如在体内、体外或离体与抗原诸如CD3(例如,T细胞表面上的CD3)或其肽片段结合。在双特异

性抗体(例如,具有一个抗CD3臂和一个识别第二生物分子(例如,细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)的臂的TDB抗体)的情况下,生物活性还可包括例如效应细胞活化(例如T细胞(例如CD8+和/或CD4+T细胞)活化)、效应细胞群体扩展(即,T细胞计数增加)、靶标细胞群体减少(即,在其细胞表面上表达第二生物分子的细胞群体减少)和/或靶标细胞杀伤。还提供在体内和/或体外具有此类生物活性的抗体。

[0404] 杀伤B细胞的活性测定

[0405] 在一些实施例中,抗体活性包括支持B细胞杀伤和/或活化细胞毒性T细胞的能力。在某些实施例中,通过本文所述的任何方法测试本公开的抗B细胞靶向抗CD3抗体(例如,抗CD20/CD3双特异性抗体或抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;例如,抗CD20/抗CD3 TDB或TCB或抗FcRH5TDB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗或西沃司他单抗)的此类B细胞杀伤和/或活化T细胞的细胞毒性效应的生物活性。在任何这些活性测定的一些实施例中,PBMC可通过FICOLL®分离从健康供体的全血中分离。特别地,可以将人血收集到肝素化注射器中,并使用Leucosep和FICOLL-PAQUE®Plus分离PBMC。如果需要,可以根据制造商的说明使用MILTENYI®试剂盒分离CD4+T和CD8+T细胞。

[0406] 可在补充有GLUTAMAX®、青霉素和链霉素的含有10% FBS的RPMI培养基中洗涤细胞,并将约20万个悬浮细胞添加至96孔U型底板中。可在潮湿的标准细胞培养箱中,在37℃在补充有10% FBS的RPMI1640中培养细胞。对于BJAB细胞杀伤测定,可以在各种浓度的TDB抗体存在下,将20,000个BJAB细胞与效应细胞(作为huPBMC或纯化的T细胞)按测定所指示的比率一起孵育24小时。对于内源性B细胞杀伤测定,可以将200,000个huPBMC与各种浓度的TDB抗体一起孵育24小时。

[0407] 培养之后,可将细胞用FACS缓冲液(0.5% BSA、0.05%叠氮化钠的PBS溶液)洗涤。然后可以将细胞在FACS缓冲液中染色,用FACS缓冲液洗涤,并悬浮于100μl含有1μg/ml碘化丙啶的FACS缓冲液中。可以在FACSCalibur流式细胞仪上收集数据并使用FLOWJO®进行分析。可通过FACS作为PI-CD19+或PI-CD20+B细胞闸控输出活B细胞,并且绝对细胞计数可以用添加至反应混合物中的作为内部计数对照的FITC珠来获得。可基于未经TDB处理的对照来计算细胞杀伤百分比(%)。可使用抗CD69-FITC和抗CD25-PE通过CD69和CD25表面表达来检测活化的T细胞。

[0408] 杀伤FcRH5表达细胞的活性测定

[0409] 在一些实施例中,抗体活性包括支持杀伤表达FcRH5的MOLP-2靶标细胞和活化T细胞的细胞毒性效应的能力。在一些实施例中,可通过流式细胞术来监测体外细胞毒性。可根据制造商的方案(Invitrogen,#C34554)用CFSE来标记靶标细胞。可以在具有或不具有双特异性抗体(例如,抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;例如,抗FcRH5/抗CD-3TDB;例如,西沃司他单抗)的情况下,将羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记的靶标细胞与来自人类PBMC的纯化CD8+T细胞以3:1比率混合48小时。可以将细胞重悬于等体积的PBS+2% FBS+1mM EDTA+碘化丙啶(PI)中。可以在FACSCalibur上以自动化形式进行流式细胞术分析。可通过对CFSE+/PI阴性细胞进行闸控来计算活靶标细胞的数量。细胞毒性的百分比可计算如下:%细胞毒性(不具有双特异性抗体时的活靶标细胞数-具有双特异性抗体时的活靶标细胞数)/(不具有双特异性抗体时的活靶标细胞数)×100。

[0410] 可通过用CD8-FITC(BD Bioscience,555634)、CD69-PE(BD Bioscience,555531)

和CD107a-Alexa-Fluor647(eBioscience,51-1079)染色来检测活化的T细胞。任选地,可通过用CD8-FITC和CD69-PE染色来检测活化的T细胞。染色之后,可将细胞用CYTOFIX/CYTOPERM®溶液(BD Bioscience,554722)固定并透化,并使用抗颗粒酶B-Alexa-Fluor647(BD Bioscience,560212)进行细胞内染色。可通过CD8+CD69+、CD8+CD107a+和CD8+CD69+GranzymeB+细胞的百分比来评估T细胞活化。

[0411] 杀伤HER2表达细胞的活性测定

[0412] 在一些实施例中,抗体活性包括支持杀伤表达HER2的SKBR3靶标细胞和活化T细胞的细胞毒性效应的能力。通过流式细胞术来监测体外细胞毒性。可根据制造商的方案(Invitrogen,#C34554)用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)来标记靶标细胞。在具有或不具有TDB的情况下,将CFSE标记的靶标细胞与来自人类PBMC的纯化CD8+T细胞以特定的E:T比率(如图解所指示)混合24小时。在孵育结束时,将细胞用胰蛋白酶提升并从板上收集。将细胞重悬于等体积的PBS+2% FBS+1mM EDTA+碘化丙啶(PI)中。在FACSCalibur上以自动化形式进行流式细胞术分析。通过对CFSE+/PI阴性细胞进行闸控来计算活靶标细胞的数量。细胞毒性的百分比计算如下:%细胞毒性(不具有TDB时的活靶标细胞数-具有TDB时的活靶标细胞数)/(不具有TDB时的活靶标细胞数)×100。

[0413] 可通过用CD8-FITC(BD Bioscience,555634)、CD69-PE(BD Bioscience,555531)和CD107a-Alexa-Fluor647(eBioscience,51-1079)染色来检测活化的T细胞。任选地,可通过用CD8-FITC和CD69-PE染色来检测活化的T细胞。染色之后,可将细胞用CYTOFIX/CYTOPERM®溶液(BD Bioscience,554722)固定并透化,并使用抗颗粒酶B-Alexa-Fluor647(BD Bioscience,560212)进行细胞内染色。可通过CD8+CD107a+细胞的百分比来评估T细胞活。

[0414] 3.稳定性测定

[0415] 用于确定药物组合物(例如,治疗性蛋白质,诸如抗体,例如双特异性抗体;例如抗CD3双特异性抗体;例如TDB或TCB)的稳定性的合适测定是本领域中已知的并且如本文所述。例如,可以多种不同方式定性和/或定量地评估药物组合物,这些方式包括评估聚集体形成(例如,使用尺寸排阻色谱、通过测量浊度和/或通过目视检测);评估活性含氧物(ROS)形成(例如,通过使用光应力测定、或2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷)二盐酸盐(AAPH)应力分析);使蛋白质的特定氨基酸残基(例如,抗体的Met残基)氧化;通过使用阳离子交换色谱、图像毛细管等电聚焦(icIEF)或毛细管区带电泳评定电荷异质性;氨基末端或羧基末端序列分析;质谱分析;SDS-PAGE分析以比较还原和完整多肽(例如,抗体);肽图(例如,胰蛋白酶或LYS-C)分析;评估蛋白质的生物活性或靶标结合功能(例如,抗体与其抗原的结合);等。不稳定性可涉及以下中的任意一者或多者:聚集、脱酰胺(例如,Asn脱酰胺)、氧化(例如,Met氧化)、异构化(例如,Asp异构化)、剪切/水解/片段化(例如,铰链区片段化)、琥珀酰亚胺形成、未配对的半胱氨酸、N末端延伸、C末端处理、糖基化差异等。示例性测定如以下实例所述。

[0416] VII.治疗方法和用途

[0417] 本文所述的药物组合物可被配制用为治疗各种疾病和疾患的药物。因此,本公开的特征在于涉及向有此需要的受试者(例如,患有疾病或疾患诸如癌症的受试者)施用药物组合物的方法。本公开的药物组合物可用于治疗有此需要的受试者(例如,有此需要的人类

受试者)的细胞增殖性疾患或延迟其进展,或增强患有细胞增殖性疾患(例如,癌症)的受试者的免疫功能。

[0418] 在一方面,本公开提供如本文所述的药物组合物,该药物组合物用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展。在一方面,本公开提供如本文所述的药物组合物在制造用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展的药物中的用途。在一方面,本公开提供了一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展的方法,该方法包括向受试者施用如本文所述的药物组合物。

[0419] 在一些实施例中,治疗性蛋白质为被配制以与位于免疫效应细胞上的CD3分子和位于除了免疫效应细胞外的靶标细胞上的靶标分子(例如,位于靶标细胞诸如B细胞或肿瘤细胞(例如,表达HER2的肿瘤细胞)上(例如,由其表达)的CD20分子、FcRH5分子或HER2)结合的双特异性抗体。在一些实施例中,双特异性抗体在与CD3分子和与靶标分子结合后活化免疫效应细胞。活化后,免疫效应细胞可对靶标细胞施加细胞毒性效应和/或细胞凋亡效应。

[0420] 在一些实施例中,例如,其中治疗性蛋白质为抗CD20/抗CD3双特异性抗体(例如,抗CD20/抗CD3 TDB或TCB;例如莫苏尼妥珠单抗或格菲妥单抗),细胞增殖性疾患为癌症,该癌症为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在一些实施例中,NHL选自由以下项组成的组:慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞淋巴瘤、脾脏弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特(Burkitt)淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、具有11q畸变的伯基特样淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金氏淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、生发中心B细胞样(GCB)弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、活化B细胞样(ABC)DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、在HHV8相关多中心卡斯尔曼病中引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、滤泡性淋巴瘤(FL)、原位滤泡性肿瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、原位套细胞瘤、急性髓系白血病(AML)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia,WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma,BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾脏淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织的结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞性淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。在特定实施例中,癌症为生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)或伯基特淋巴瘤(BL)。

[0421] 在一个实施例中,NHL为弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、高级别B细胞淋巴瘤(HGBCL)、源自滤泡性淋巴瘤(FL)的DLBCL[转化FL;trFL]、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)或边缘区淋巴瘤(MZL)。MZL可分类为脾MZL、淋巴结MZL和结外MZL。在一个实施例中,NHL为套细胞淋巴瘤(MCL)。在一个实施例中,NHL为1-3a级滤泡性淋巴瘤(FL)。在一个实

施例中,CD20阳性B细胞增殖性疾患为复发性或难治性B细胞增殖性疾患。在一个实施例中,复发性或难治性B细胞增殖性疾患为复发性或难治性NHL(例如,复发性或难治性DLBCL、复发性或难治性FL、或复发性或难治性MCL)。

[0422] 在一些实施例中,例如,当治疗剂为抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体(例如,抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)时,细胞增殖性疾患为癌症,该癌症为多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、急性髓系白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓系白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病(APL)、慢性骨髓增殖性疾患、血小板性白血病、前体B细胞急性淋巴细胞白血病(pre-B-ALL)、前体T细胞急性淋巴细胞白血病(pre-T-ALL)、肥大细胞病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、髓系肉瘤、淋巴细胞白血病和未分化白血病。在特定实施例中,癌症为多发性骨髓瘤(MM),其可以为复发性或难治性(R/R)MM。在一些实施例中,癌症为FcRH5阳性癌症。

[0423] 在一些实施例中,癌症选自由以下项组成的组:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。在一些实施例中,癌症为HER2阳性癌症。

[0424] 在一些实施例中,例如,当治疗性蛋白质为抗HER2/抗CD3双特异性抗体(例如,抗HER2/抗CD3 TDB;例如,芦莫妥单抗)时,癌症为HER2阳性癌症(例如,HER2阳性乳腺癌或HER2阳性胃癌)。在特定实施例中,HER2阳性癌症为HER2阳性乳腺癌或HER2阳性胃癌。HER2阳性癌症(例如,HER2阳性乳腺癌或HER2阳性胃癌)的特征可以在于以每个细胞至少200,000个的拷贝数(例如,平均拷贝数)(例如,每个细胞至少250,000个HER2拷贝、每个细胞至少300,000个HER2拷贝、每个细胞至少400,000个HER2拷贝、每个细胞至少500,000个HER2拷贝、每个细胞至少600,000个HER2拷贝、每个细胞至少700,000个HER2拷贝、每个细胞至少750,000个HER2拷贝、每个细胞至少800,000个HER2拷贝、每个细胞至少900,000个HER2拷贝、每个细胞至少1,000,000个HER2拷贝、每个细胞至少1,200,000个HER2拷贝、每个细胞至少1,500,000个HER2拷贝、每个细胞至少2,000,000个HER2拷贝、每个细胞至少2,500,000个HER2拷贝、每个细胞至少3,000,000个HER2拷贝或更多,例如,每个细胞200,000至2,000,000个HER2拷贝、每个细胞300,000至1,500,000个HER2拷贝、每个细胞400,000至1,200,000个HER2拷贝、或每个细胞500,000至1,000,000个HER2拷贝,例如,每个细胞200,000至1,000,000个HER2拷贝(例如,每个细胞200,000至250,000个HER2拷贝、每个细胞250,000至300,000个HER2拷贝、每个细胞300,000至400,000个HER2拷贝、每个细胞400,000至500,000个HER2拷贝、每个细胞500,000至750,000个HER2拷贝、或每个细胞750,000至1,000,000个HER2拷贝)、或每个细胞1,000,000至3,000,000个HER2拷贝(例如,每个细胞1,000,000至1,500,000个HER2拷贝、每个细胞1,500,000至2,000,000个HER2拷贝、每个细胞2,000,000至2,500,000个HER2拷贝、或每个细胞2,500,000至3,000,000个HER2拷贝)表达HER2的肿瘤细胞。

[0425] 治疗性蛋白质(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)可被配制用于以约10μg至约100mg(例如,约100mg至80mg、500μg至50mg、或1mg至20mg,例如,10μg至50μg、50μg至100μg、100μg至200μg、200μg至500μg、500μg至1mg、1mg至5mg、5mg至10mg、10mg至20mg、20mg至30mg、30mg至40mg、

40mg至50mg、50mg至60mg、60mg至70mg、70mg至80mg、80mg至90mg、或90至100mg,例如,约10μg、约20μg、约25μg、约30μg、约40μg、约50μg、约60μg、约70μg、约75μg、约80μg、约90μg、约100μg、约200μg、约250μg、约300μg、约400μg、约500μg、约600μg、约700μg、约750μg、约800μg、约900μg、约1mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约75mg、约80mg、约90mg或约100mg)的剂量向受试者施用。

[0426] 在一些实施例中,治疗性蛋白质为被配制用于以约10μg至约100mg(例如,100μg至80mg、500μg至50mg、或1mg至20mg,例如,约10μg至50μg、50μg至100μg、100μg至200μg、200μg至500μg、500μg至1mg、1mg至5mg、5mg至10mg、10mg至20mg、20mg至30mg、30mg至40mg、40mg至50mg、50mg至60mg、60mg至70mg、70mg至80mg、80mg至90mg、或90至100mg,例如,约10μg、约20μg、约25μg、约30μg、约40μg、约50μg、约60μg、约70μg、约75μg、约80μg、约90μg、约100μg、约200μg、约250μg、约300μg、约400μg、约500μg、约600μg、约700μg、约750μg、约800μg、约900μg、约1mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约75mg、约80mg、约90mg或约100mg)的剂量向受试者施用的双特异性抗体(例如,TDB或TCB)。在特定实施例中,治疗性蛋白质为被配制用于以约1mg至约60mg的剂量向受试者施用的双特异性抗体。

[0427] 在一些实施例中,药物组合物(例如,包含抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;例如,抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)在不被稀释的情况下向受试者施用(例如,以约1mg/ml或约3ml/ml的浓度)。在一些实施例中,药物组合物在用盐水溶液稀释之后向受试者施用。在一些实施例中,盐水溶液为生理盐水溶液。在一些实施例中,生理盐水溶液包含氯化钠(NaCl)。在一些实施例中,生理盐水溶液包含在0.1%至1.5%之间(例如,在0.1%至1.2%之间、在0.3%至1.5%之间、在0.4%至0.5%之间、在0.3%至1%之间、在0.8%至1%之间、在0.85%至0.95%之间;例如,约0.1%、约0.3%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.85%、约0.9%、约0.95%、约1%或约1.2%)(w/v)的NaCl)。在特定实施例中,生理盐水溶液包含0.45%或0.9%(w/v)NaCl。

[0428] 在一些实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度为约0.001mg/ml至约0.6mg/ml(例如,约0.001mg/ml、约0.002mg/ml、约0.003mg/ml、约0.004mg/ml、约0.005mg/ml、约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.03mg/ml、约0.04mg/ml、约0.05mg/ml、约0.75mg/ml、约0.1mg/ml、约0.11mg/ml、约0.12mg/ml、约0.13mg/ml、约0.14mg/ml、约0.15mg/ml、约0.16mg/ml、约0.17mg/ml、约0.18mg/ml、约0.19mg/ml、约0.2mg/ml、约0.21mg/ml、约0.22mg/ml、约0.23mg/ml、约0.24mg/ml、约0.25mg/ml、约0.26mg/ml、约0.27mg/ml、约0.28mg/ml、约0.29mg/ml、约0.3mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml或约0.6mg/ml)。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性蛋白质(例如,抗体;例如,双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)的浓度为约0.003mg/ml、约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.03mg/ml、约0.04mg/ml、约0.12mg/ml、约

0.24mg/ml或约0.3mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗CD20/抗CD3双特异性抗体;抗CD20/抗CD3 TDB;例如,莫苏尼妥珠单抗)的浓度为约0.01mg/ml、约0.02mg/ml、约0.04mg/ml、约0.12mg/ml、约0.24mg/ml或约0.3mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗CD20/抗CD3双特异性抗体;抗CD20/抗CD3 TCB;例如,格菲妥单抗)的浓度为约0.1mg/ml或约0.6mg/ml。在特定实施例中,在用生理盐水溶液稀释之后,治疗性抗体(例如,抗体;双特异性抗体;抗FcRH5/抗CD3双特异性抗体;抗FcRH5/抗CD3 TDB;例如,西沃司他单抗)的浓度为约0.003mg/ml、0.03mg/ml或0.3mg/ml。

[0429] 本公开进一步提供将治疗性蛋白质(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)与至少一种另外的治疗剂(例如,一种、两种、三种、四种或更多种另外的治疗剂)共同施用的方法,还公开了这些方法。例如,另外的治疗剂包括PD-1轴结合拮抗剂,诸如PD-L1结合拮抗剂、PD-1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。用于方法和药物组合物中的PD-L1结合拮抗剂包括例如阿特珠单抗(MPDL3280A)、MDX-1105(BMS-936559)和MEDI4736(德瓦鲁单抗)。例如,在一些特定情况下,抗PD-L1抗体为阿特珠单抗(CAS注册号:1422185-06-5)。MDX-1105(也称为BMS-936559)为PCT公开号WO 2007/005874和PCT公开号WO 2016/201425中所述的抗PD-L1抗体。MEDI4736(德瓦鲁单抗)为PCT公开号WO 2011/066389和美国专利公开号2013/034559中所述的抗PD-L1单克隆抗体。用于本公开的方法的抗PD-L1抗体及其制备方法描述于PCT公开号WO 2010/077634、WO 2007/005874和WO 2011/066389以及美国专利第8,217,149号和美国专利公开号2013/034559中,这些文献以引用方式并入本文。

[0430] PD-1结合拮抗剂包括抗PD-1抗体,诸如选自由以下项组成的组的抗PD-1抗体:MDX-1106(纳武单抗)、MK-3475(帕博利珠单抗)、MEDI-0680(AMP-514)、PDR001、AMG 404、REGN2810(西米普利单抗;LIBTAYO®)和BGB-108。MDX-1106也称为MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558或纳武单抗,为PCT公开号WO 2006/121168中所述的抗PD-1抗体。MK-3475也称为派姆单抗或lambrolizumab,为PCT公开号WO 2009/114335中所述的抗PD-1抗体。在其他情况下,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PD-L1或PD-L2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在其他情况下,PD-1结合拮抗剂为REGN2810(LIBTAYO®)(也称为西米普利单抗)。在其他情况下,PD-1结合拮抗剂为PCT公开号WO 2017/058780中所述的AMP-224、B7-DC Fc或PD-L2 Fc融合蛋白。

[0431] PD-L2结合拮抗剂包括例如抗体(例如,抗PD-L2抗体)和免疫粘附素。在一些实施例中,另外的治疗剂包括奥妥珠单抗(抗CD20抗体)、利妥昔单抗(抗CD20抗体)、抗体-药物缀合物(ADC)、皮质类固醇或托珠单抗(抗IL-6R抗体)。

[0432] 例如,在涉及具有抗CD3臂和抗CD20臂的双特异性抗体的情况下,可用于共同施用的另外的治疗剂可为ADC,诸如抗CD79b ADC(例如,维泊妥珠单抗)。

[0433] 在本文所述的方法涉及组合疗法诸如上述特定组合疗法的情况下,组合疗法涵盖治疗性蛋白质与一种或多种另外的治疗剂的共同施用,并且此类共同施用可以为组合施用或单独施用。此外,两种或更多种治疗剂可以一起配制或分开配制。在其中两种或更多种治疗剂单独施用的情况下,治疗性蛋白质的施用可发生在一种或多种另外的治疗剂的施用之前、同时和/或之后。

[0434] 治疗剂可例如经静脉内、皮下、皮内、肌内、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、外用、肿瘤内、腹膜、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐内、眼内、口服、外用、局部、通过吸入、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过局部灌注直接浸泡靶标细胞、通过导管、通过灌洗、经乳脂或脂质组合物来施用。

[0435] 在一个实施例中,治疗性蛋白质的施用和另外的治疗剂的施用彼此发生在约一个月内,或发生在约一周、两周或三周内,或发生在约一天、两天、三天、四天、五天、或六天内。

[0436] 本文所述的方法可导致正在用治疗性蛋白质(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)治疗的癌症患者的获益-风险特征得以改善。在一些情况下,使用本文所述的导致在分次、剂量递增给药方案的背景下施用治疗性蛋白质的方法的治疗可使得在使用本公开的分次、剂量递增给药方案用治疗性蛋白质治疗后,相对于使用非分次给药方案用抗CD20/抗CD3双特异性抗体治疗,不良事件减少(例如,减少20%或更多、25%或更多、30%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更高,75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、96%或更多、97%或更多、98%或更多、或99%或更多)或完全抑制(100%减少),这些不良事件诸如细胞因子驱动的毒性(例如细胞因子释放综合征(CRS))、输注相关反应(IRR)、巨噬细胞活化综合征(MAS)、神经系统毒性、重度肿瘤溶解综合征(TLS)、中性粒细胞减少症、血小板减少症、肝酶升高和/或中枢神经系统(CNS)毒性。

[0437] 对于本文所述的所有方法和药物制剂,治疗性蛋白质将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这种情况下需要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排,以及执业医师已知的其他因素。治疗性蛋白质并非必须、而是任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论的疾患的制剂共同配制。此类其他药剂的有效量取决于调配物中存在的治疗性蛋白质的量、疾患或治疗的类型、以及上面讨论的其他因素。治疗性蛋白质可在一系列治疗中适当地向患者施用。

[0438] VIII.制品

[0439] 在本发明的另一方面中,提供了一种制品,其含有可用于治疗、预防和/或诊断上述疾患的物质。该制品包括容器和在该容器上或与该容器相关的标签或包装插页(package insert)。合适的容器包括例如,瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。该容器可以由诸如玻璃或塑料等多种材料形成。容器可容纳药物组合物,该药物组合物本身或与另一种组合物组合能够有效地治疗、预防和/或诊断病症,并且该容器可以具有无菌进入口(例如,该容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂为如本文所述的治疗性蛋白质(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)。标签或包装插页指示该组合物用于治疗所选择的病况(例如,癌症),并且进一步包括关于本文所述的给药方案中的至少一者的信息。

[0440] 可在具有1ml至100ml(例如,1ml至5ml、5ml至10ml、10ml至15ml、15ml至20ml、20ml至25ml、25ml至30ml、30ml至40ml、40ml至50ml、50ml至60ml、60ml至70ml、70ml至80ml、80ml至90ml、或90ml至100ml,例如,约1ml、约1.5ml、约2ml、约2.5ml、约3ml、约3.5ml、约4ml、约

4.5ml、约5ml、约10ml、约15ml、约20ml、约25ml、约30ml、约40ml、约50ml、约60ml、约70ml、约80ml、约90ml或约100ml)的体积的容器中供应药物组合物。在特定实施例中,容器具有约50ml(例如,约40ml、约45ml、约46ml、约47ml、约48ml、约49ml、约50ml、约51ml、约52ml、约53ml、约54ml、约55ml或约60ml)的体积。在另一特定实施例中,容器具有约2ml(例如,约1ml、约1.5ml、约1.6ml、约1.7ml、约1.8ml、约1.9ml、约2ml、约2.1ml、约2.2ml、约2.3ml、约2.4ml、约2.5ml或约3ml)的体积。在又一特定实施例中,容器具有约15ml(例如,约10ml、约11ml、约12ml、约13ml、约14ml、约15ml、约16ml、约17ml、约18ml、约19ml或约20ml)的体积。在又一实施例中,容器具有约2.5ml或约10ml的体积。

[0441] 在一些实施例中,容器为不锈钢容器或镍钢合金容器(例如,HASTELLOY®),诸如桶、微型桶、小罐、罐等。在一些情况下,此类容器中的药物组合物为DS,其可在使用前进一步稀释,例如,稀释为DP(例如,在最终的小瓶构造中)。替代性地,容器中的药物组合物为DP。在一些实施例中,如果DP与稀释剂一起施用,或者如果其旨在与其他治疗试剂组合施用,则DP的浓度可能高于其待向受试者施用的浓度。在一些实施例中,DP在容器诸如IV袋或注射器中(例如,用于经由注射泵递送)。

[0442] 在一些实施例中,制品包括具有约1ml或更大(例如,约1ml、约2ml、约3ml、约4ml、约5ml、约6ml、约7ml、约8ml、约9ml、约10ml、约11ml、约12ml、约13ml、约14ml、约15ml、约16ml、约17ml、约18ml、约19ml、约20ml、约25ml、约30ml、约35ml、约40ml、约50ml或更大)的体积的小瓶,。在特定实施例中,小瓶具有约50ml(例如,约40ml、约45ml、约46ml、约47ml、约48ml、约49ml、约50ml、约51ml、约52ml、约53ml、约54ml、约55ml或约60ml)的体积。在另一特定实施例中,小瓶具有约2ml(例如,约1ml、约1.5ml、约1.6ml、约1.7ml、约1.8ml、约1.9ml、约2ml、约2.1ml、约2.2ml、约2.3ml、约2.4ml、约2.5ml或约3ml)的体积。在又一特定实施例中,小瓶具有约15ml(例如,约10ml、约11ml、约12ml、约13ml、约14ml、约15ml、约16ml、约17ml、约18ml、约19ml或约20ml)的体积。在特定实施例中,小瓶具有2.5ml或10ml的体积。在一些实施例中,小瓶为一次性小瓶。在一些实施例中,小瓶含有约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg或更多治疗性蛋白质。在一些实施例中,小瓶包括药物组合物,该药物组合物包含治疗性蛋白质(例如,抗CD3双特异性抗体;例如,TDB或TCB;例如,莫苏尼妥珠单抗、格菲妥单抗、西沃司他单抗或芦莫妥单抗)、聚山梨醇酯20(PS20)、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中该PS20与该治疗性蛋白质的摩尔比为100或更低,该PS20的浓度为0.01%至0.12%重量/体积(weight-by-volume,w/v),该甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且该缓冲剂的浓度为5mM至20mM。在一些实施例中,容器闭合系统包括玻璃小瓶、塞子和封盖中的一者或多者或全部。

[0443] 此外,制品可包含:(a)其中含有组合物的第一容器,其中该药物组合物包含本文所述的治疗性蛋白质;和(b)其中含有药物组合物的第二容器,其中该药物组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。替代性地或除此之外,所述制品可以还包括第二(或第三)容器,该二(或第三)容器包含药用缓冲剂,诸如抑菌性供注射的水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏液和右旋糖溶液。药盒可进一步包括从商业和用户角度所需的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0444] 实例

[0445] 以下是本公开的方法和组合物的实例。应当理解,鉴于上面提供的一般描述,可以实践各种其他实施例,并且实例不旨在限制权利要求的范围。

[0446] 实例1.莫苏尼妥珠单抗的药物开发

[0447] 本实例显示配制和使用莫苏尼妥珠单抗(BTCT4465A)的方法。对于莫苏尼妥珠单抗,研究人员观察到,在制剂中,相对较低的蛋白质浓度和相对较高的表面活性剂浓度被任为对于确保准确递送低剂量莫苏尼妥珠单抗更优选。

[0448] 莫苏尼妥珠单抗基于人类IgG1同种型,并且旨在通过T细胞募集和活化来治疗B细胞恶性肿瘤。莫苏尼妥珠单抗的CD20臂针对B淋巴细胞抗原CD20(在B细胞的表面上表达的糖基化磷蛋白)。CD3臂与T细胞结合并募集T细胞,这些细胞在与CD20靶标接合后活化,导致稳健的T细胞增殖和细胞杀伤。

[0449] 包含莫苏尼妥珠单抗(BTCT4465A)的氨基酸序列汇总于上表1中。

[0450] 在两种单独CHO细胞系中使用杵臼技术生产重组莫苏尼妥珠单抗,包括糖基化突变N297G以降低或消除ADCC功能。莫苏尼妥珠单抗由一个带杵的抗CD20半抗体(抗CD20臂)和一个带臼的抗CD3半抗体(抗CD3臂)构成,使用谷胱甘肽还原来组装该半抗体。莫苏尼妥珠单抗对惰性(例如,不分裂)和化疗抗性细胞具有活性,并且对肿瘤的在先免疫反应不是活性的先决条件。

[0451] 莫苏尼妥珠单抗原料药(DS)和药物产品(DP)被配制为在20mM组氨酸乙酸盐(HisOAc)、240mM蔗糖和0.02%(w/v)聚山梨醇酯20(PS20)(在pH 5.8下)中的60mg/ml莫苏尼妥珠单抗。为生产莫苏尼妥珠单抗DP,将1.0ml标称灌装量的DS灌装到2.0ml小瓶中。在该实例中,莫苏尼妥珠单抗DS具有的表面活性剂与治疗性蛋白质的摩尔比为约0.4。

[0452] 60mg/ml蛋白质浓度先前支持在临床上使用注射泵递送各种剂量(50μg至30mg),其中使用制剂缓冲液和盐水两者作为稀释剂分两步稀释最低剂量的组合物浓度。由于使用分步给药方案,后续和正在进行的临床试验中的剂量范围有所不同,在第1周期期间,患者在第1天接受低剂量(例如,1mg),在第8天接受中等剂量(例如,2mg),并且在第15天接受全剂量(例如,20mg)。当将蛋白质浓度与低或高表面活性剂水平配对时,考虑到若干制剂选项(图1)。特别地,相对低的蛋白质浓度和相对高的表面活性剂浓度被认为对于确保使用静脉内输液(IV)袋准确递送低剂量、减少或避免使用稀释剂、允许灵活给药并减少或消除废液更优选。

[0453] 实例2.莫苏尼妥珠单抗制剂开发的知识建构研究

[0454] 在早期开发之后进行知识建构研究,以评估制剂参数对制剂稳定性的影响,并鉴定制剂的主要风险。重要的是,此研究的结果表明,氧化降解(例如,与其他形式的降解(诸如聚集、片段化和表面活性剂降解)相关的氧化降解)为临床III期DP制剂(即,低浓度莫苏尼妥珠单抗DP制剂)的主要风险因素。此外,此研究的结果表明,低蛋白质浓度的莫苏尼妥珠单抗制剂可能对氧化降解敏感,特别是那些具有高组氨酸浓度、低蔗糖浓度和高PS20浓度的制剂。此外,此研究的结果表明,添加甲硫氨酸(L-甲硫氨酸;L-Met)抑制氧化降解,从而降低其他形式的降解(例如,聚集、碎裂和/或表面活性剂降解)的风险。

[0455] 实例3.莫苏尼妥珠单抗制剂开发

[0456] 本实例中研究的目的为表征与具有莫苏尼妥珠单抗的药物组合物相关联的风险,

并鉴定降低这些风险的制剂参数。对研究进行汇总,并表征了DS和DP制剂的各种组分及其可能储存的容器的影响。研究还发现,此类制剂的重要特征是莫苏尼妥珠单抗与表面活性剂的摩尔比,其中蛋白质以低摩尔浓度存在,并且表面活性剂以较高摩尔浓度存在。

[0457] 3.1.IV袋搅拌研究

[0458] 为确定用于使用IV袋递送且不使用支持宽剂量范围的稀释剂的制剂中表面活性剂的适当的量和组成,进行IV袋搅拌研究。对若干因素进行表征,包括蛋白质浓度、剂量、IV袋尺寸、表面活性剂组成和表面活性剂浓度。

[0459] 莫苏尼妥珠单抗在20mM HisOAc、240mM蔗糖(pH 5.8)中以不同蛋白质浓度(1mg/ml、5mg/ml和10mg/ml)进行配制。测试一系列剂量(1mg、2mg、5mg、20mg和30mg),并对50ml和100ml聚氧乙烯(PO)袋进行评定。50ml和100ml POIV袋先前已被确定为高风险IV袋,因为其相对于相对应尺寸的聚氯乙烯(PVC)IV袋具有相对较大的顶部空间和相对高的壁刚性,导致蛋白质聚集。对三种表面活性剂进行评估:聚山梨醇酯20(PS20)、泊洛沙姆188(P188)和超精制聚山梨醇酯20(srPS20)。对PS20和P188在整个剂量范围内进行测试,鉴于srPS20在搅拌研究中与PS20的可比性,对srPS20进行有限测试。接着中止SrPS20以简化研究。

[0460] 在这些实验中,改变DP表面活性剂浓度以确定在IV袋搅拌应力期间防止聚集和颗粒形成所需的IV袋中的最小表面活性剂浓度。在每种测试条件下,将莫苏尼妥珠单抗DP注射到IV袋中,并在2℃至8℃在轨道摇床上以100rpm振摇长达24小时。在0小时、1小时、6小时和24小时取样,并通过高准确度液体颗粒计数(HIAC)评定亚可见颗粒,并通过尺寸排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)评定可溶性聚集体。如果可溶性聚集体或颗粒计数无显著增加,则认为条件符合要求。与时间0相比,通过在SE-HPLC色谱图中观察到的定性变化来评定可溶性聚集体的增加。与时间0相比,观察到颗粒形成作为亚可见颗粒计数显著增加(每ml≥2μm的累积颗粒计数增加>1,000)。

[0461] 对来自此研究的数据进行分析,以确定在不使用稀释剂的情况下支持III期和商业剂量施用所需的IV袋中表面活性剂的最小量。图2显示DP蛋白质浓度和剂量如何共同影响100ml POIV袋中所需的最小PS20浓度。对于50ml POIV袋,观察到类似的结果。相对高的PS20浓度对蛋白质浓度的比率(例如,对于低剂量,诸如1mg/ml)确保在IV袋中的最终给药溶液中具有足够的表面活性剂水平。这些结果表明,PS20对蛋白质浓度的高比率可以更好地确保低DP剂量(例如,1mg/ml)下的蛋白质稳定性,例如,在IV袋中。

[0462] 为1mg/ml DP(被鉴定为支持低剂量施用的有效蛋白质浓度)确定每种表面活性剂组成的最小合适的表面活性剂水平,如图3所示。确定最小0.05%(w/v)PS20(表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约59)和超精制PS20(srPS20)以及最小0.08%(w/v)P188(表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约14)对于在上述振摇应力条件下防止聚集和颗粒形成为必需的。为支持制造范围,将PS20目标水平设定为0.06%(w/v)(表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约71),并将P188目标水平设定为0.10%(w/v)(表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约17),用于接下来的DP制剂开发。

[0463] 3.2.表面活性剂的产品质量影响

[0464] 在稳定性研究中评估不同表面活性剂类型的产品质量影响(PQI)。由于在知识建构研究(实例2)中观察到的氧化效应,莫苏尼妥珠单抗的氧化风险受到特别关注。此外,已知PS20对氧化敏感,并且高水平的PS20(例如0.06%,由IV袋搅拌研究选择)可能增加蛋白

质氧化的风险。在此研究中,在全因子研究中评估蛋白质浓度(60mg/ml、10mg/ml和1mg/ml)和表面活性剂组成(PS20、srPS20和P188)。所有材料均用20mM HisOAc、240mM蔗糖和0.1%(w/v)表面活性剂(在pH 5.8下)以相应蛋白质浓度配制。对于作为表面活性剂的PS20或srPS20,蛋白质浓度为60mg/ml、10mg/ml和1mg/ml时,表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比分别为约2、12和119。对于作为表面活性剂的P188,蛋白质浓度为60mg/ml、10mg/ml和1mg/ml时,表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比分别为约0.3、1.7和17。将样品以3ml的灌装体积手工灌装到6ml玻璃小瓶中,使用标准组件盖上塞子并盖上盖子,并在40℃储存长达一个月且在30℃储存长达三个月。测定包括用于对氧化进行定量的肽图分析、用于对聚集和颗粒形成进行定量的HIAC、用于对表面活性剂降解进行量化的蒸发光散射检测器(ELSD)以及用于对尺寸异质性进行定量的SE-HPLC。

[0465] 在包括PS20或P188的组合物中,Met 257(M257)氧化仅随蛋白质浓度从60mg/ml降低至1mg/ml而略微增加(图4A和图4B)。然而,对于srPS20,在1mg/ml蛋白质浓度下,氧化显著增加(图4C)。在1mg/ml srPS20样品中,还观察到片段化和聚集的增加以及表面活性剂的损失。基于这些结果,将srPS20排除在用于莫苏尼妥珠单抗制剂的表面活性剂选择之外。

[0466] 3.3.组氨酸浓度、环境光暴露和抗氧化剂筛选

[0467] 组氨酸对氧化敏感,并且它在制剂缓冲液中的存在可能诱导蛋白质氧化。在该实例中,进一步表征了组氨酸浓度的影响。实例2中所述的知识建构研究和上述表面活性剂类型研究表明,莫苏尼妥珠单抗对热应力引起的氧化敏感。然而,光应力对莫苏尼妥珠单抗的影响尚未得到表征。这里,对莫苏尼妥珠单抗的色氨酸残基对氧化的敏感性进行定量。

[0468] 评估了两种制剂受到的热应力的影响,并评估了四种制剂受到的光应力的影响(表6)。除指定的组成以外,所有制剂均包括1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、160mM蔗糖、0.04%(w/v)PS20(pH 5.5)。在该实例中,表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约48。在知识建构研究中,将制剂7(F7)鉴定为存在因热应力而导致高度氧化的风险。本研究中包括低浓度组氨酸F7制剂(F7-低浓度His)以评估降低浓度组氨酸浓度的影响。在光应力研究中,F7补充有抗氧化剂甲硫氨酸(单独使用或与N-乙酰基色氨酸(NAT)组合使用),以评估抗氧化剂对光应力介导的降解的影响。将制剂灌装到6ml小瓶中,灌装体积为3ml,盖上塞子、盖上盖子,并置于热应力(在40℃持续长达一个月,在25℃持续长达三个月)和环境光应力(在25℃的300,000勒克司-小时)下。通过将样品在荧光灯箱中在室温和5500勒克司光强度下孵育54小时来进行环境光暴露。测定包括用于对氧化进行定量的肽图分析、用于对聚集和颗粒形成进行定量的HIAC、用于对表面活性剂降解进行定量的ELSD以及用于对尺寸异质性(例如,作为片段化和/或聚集的结果)进行定量的SE-HPLC。

[0469] 表6

用于氧化研究的制剂总结

[0470]

制剂	His (mM)	Met (mM)	NAT (mM)	热应力	光应力
F7	30	0	0	X	X
F7 + Met	30	5	0		X
F7 + Met + NAT	30	5	5		X
F7-低 His	10	0	0	X	X

[0471] 对40℃热应力条件下含有不同水平的组氨酸(F7和F7-低浓度His)的组合物进行

了比较。两个样品均不含抗氧化剂。如图5所示,30mM组氨酸组合物在40℃保持两周之后表现出大约6%的M257氧化,而10mM组氨酸组合物表现出小于1%的M257氧化。此外,二聚体和高分子量物质(HMWS)两者的聚集水平还在30mM组氨酸样品中更高。结果表明,较高的表面活性剂水平和较低的HisOAc浓度可以更好地防止热应力条件下的氧化应力。

[0472] 在环境光暴露(可诱导氧化的敏感应力类型)下评估组氨酸浓度和抗氧化剂的影响。如图6所示,在任何测试的样品中均未观察到任何位点(Met或Trp)处的氧化发生实质性变化,表明F7在相关环境光应力下是稳定的,尽管其氧化风险较高。NAT未提供额外益处,且因此不包括在后续的制剂开发中。

[0473] 3.4.甲硫氨酸浓度优化

[0474] 进行过氧化氢加标研究以鉴定甲硫氨酸(被鉴定为重要的赋形剂)的优选浓度。在使用或不使用过氧化氢(H_2O_2)和不同水平Met的情况下制备含有1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08%(w/v)PS20、160mM蔗糖(在pH 5.8下)的样品(对照制剂)(表7)。在这些样品中,表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约95。对照制剂具有高氧化风险,因为它含有相对高浓度的组氨酸、相对高浓度的PS20和相对低浓度的蔗糖。

[0475] 使用过氧化氢(2,000ng/ml)作为抗氧化剂保护的氧化应力挑战。将样品灌装到20cc小瓶中,灌装体积为3ml,以表示由于顶部空间大而具有高氧化风险的容器条件。将小瓶盖上塞子、盖上盖子,并在40℃放置一个月或在25℃放置六个月以研究热稳定性,或研究实时稳定性(即,在2℃至8℃)。在环境光研究中,样品在室温经受高达300,000勒克司-小时(在5,500勒克司下暴露54小时)的环境光暴露。在0小时、24小时、48小时和54小时的时间点从环境光研究中获得样品,并包括用铝箔包裹的暗处对照。使用AMPLEX®过氧化氢/过氧化物酶测定(ThermoFisher Scientific;Waltham,MA)测量过氧化氢浓度。用于监测产品质量(例如,稳定性)的测定包括颜色、pH、浊度(通过紫外光谱(UV-spec))、强度(通过UV-spec)、电荷变体(通过成像毛细管等电聚焦(icIEF)和微芯片筛分电泳(MCE-SDS))、尺寸异质性(通过SE-HPLC)、可见颗粒和亚可见颗粒(通过HIAC)、效力、氧化(通过肽图分析)、甲硫氨酸浓度(通过质谱)和聚山梨醇酯浓度(通过ELSD)。

[0476]

表 7

用于甲硫氨酸研究的制剂总结

样品[a]	Met (mM)	H_2O_2 (ng/ml)
对照	0	0
+ H_2O_2	0	2000
+ H_2O_2 + Met 2.5	2.5	2000
+ Met 5	5	0
+ H_2O_2 + Met 5	5	2000
+ H_2O_2 + Met 10	10	2000

[0477] [a]除表中指定的组成以外,所有样品均含有1mg/ml莫苏尼妥珠单抗、15mM组氨酸乙酸盐、0.08%(w/v)PS20、160mM蔗糖并且pH为5.8。

[0479] 在2℃至8℃(例如,5℃)储存12个月之后,不含Met的制剂中存在的H_2O_2被完全耗竭(图7A)。在12个月时,观察到41.5%的M257氧化,而对照样品中则有3.7%的M257氧化(图

7B)。在向制剂中添加最少2.5mM Met的情况下,H_2O_2在一个月之后被完全消耗(图7A),并且在整个研究期间M257氧化与对照样品保持等效(图7B)。在含有2.5mM、5mM和10mM Met的制剂之间,未观察到差异。未观察到其他属性的变化。

[0480] 在加速热条件下(即,25℃),不含Met的样品中的H_2O_2水平在两个月内降至130ng/ml,且随后在六个月内累积回1,000ng/ml的水平(图8A)。对照样品在两个月之后也表现出H_2O_2的增加(图8A)。该观察结果与不含Met的加标样品在前两个月中由M257所代表的Met氧化缓慢阶段以及不含Met的加标样品和对照在后半部分长达6个月的Met氧化快速阶段(图8C)一致。该观察结果也与不含Met的加标样品和对照样品两者在两个月与六个月之间的CD20臂中的色氨酸107(即,Trp107或W107)氧化的增加(图8B)、蛋白质聚集(图8D)和片段化(图8E)一致。所观察到的该H_2O_2的产生可能与对照和没有Met的加标样品两者中的PS20氧化降解有关,该氧化降解可触发进一步的蛋白质降解。相比之下,在添加2.5mM至10mM Met后,H_2O_2在一周之后被完全消耗并且在六个月孵育过程中未重新累积(图8A)。在六个月孵育中,M257氧化、W107氧化、聚集、片段化和PS20降解通过2.5mM Met得以大大减少且通过5mM和10mM Met得以完全抑制(图8B至图8E),表明在这些条件下,5mM Met为作为该制剂中的抗氧化剂的最低要求。在40℃较短时间尺度的应力稳定性结果中观察到类似的趋势。

[0481] 表8中的所有样品均也经历在25℃的环境光应力(高达300,000勒克司-小时)。与组氨酸浓度研究一致,环境光不引起广泛氧化,并且在不含Met的样品中产生的轻微M257氧化通过2.5mM Met添加得以完全抑制。

表 8

DP 制剂总结

[0482]

制剂[a]	组氨酸乙酸盐 (mM)	pH	PS20 (%w/v)	蔗糖 (mM)	Met (mM)
1 (靶标)	10	5.8	0.06	240	5
2	15	5.5	0.08	160	2.5
3	15	5.8	0.08	160	2.5

[0483]

4	15	6.1	0.08	160	2.5
5	15	5.8	0.08	160	5

[0484] [a]所有制剂均含有1mg/ml莫苏尼妥珠单抗。

[0485] 3.5 DP制剂筛选

[0486] 基于从上述研究中获得的信息,进行DP制剂筛选研究。在不同pH和Met浓度下对目标制剂和高风险氧化(高浓度His、高浓度PS20、低浓度蔗糖)进行评估。每种制剂均被无菌过滤,并灌装到15ml玻璃小瓶中,灌装体积为5ml。将小瓶用20-mm Daikyo D777-1液体塞子(Daikyo;Tochigi,Japan)塞住,用铝制可翻转瓶盖盖上盖子,并根据表9中指定的程序稳定地直立储存。测定被配置为观察颜色、pH、浊度(通过UV-spec)、强度(通过UV-spec)、电荷变体(通过icIEF和mCE-SDS)、尺寸异质性(通过SE-HPLC)、可见颗粒和亚可见颗粒(通过HIAC)、效力、氧化(通过肽图分析)、甲硫氨酸浓度(通过质谱)和聚山梨醇酯浓度(通过ELSD)。

[0487]

表 9

DP 制剂采样时间点

储存温度/时间点	T0	3D	1W	2W	3W	1M	2M	3M	6M	9M	12M	18M	24M
5°C	X*					X	X	X	X	X	X	X	X
25°C, 65% RH				X		X	X	X	X				
40 °C, 75% RH		X	X	X	X	X							

[0488] X＝3个小瓶;X*＝5个小瓶;D＝天,W＝周,M＝月

[0489] 制剂的零时(T_0)表征汇总于表10中。在5℃储存12个月之后,未观察到任何制剂有变化(表11)。在5℃储存24个月之后,通过iCIEF和CE-SDS观察到所有五种制剂具有一致的变化。在5℃24个月之后,通过icIEF确定的酸性变体百分比有小幅增加,并且峰前的CE-SDS结果似乎显示略微增加,但观察到所有制剂的情况均相同。通过任何其他测定均未观察到变化。

[0490] 在25℃、60％相对湿度(RH;加速条件)下储存六个月之后(表12),在所有五种制剂中观察到类似的变化:SE-HPLC主峰降低(0.3％至0.4％)、icIEF酸性增加和主峰降低(12.6％至17％)以及mCE-SDS主峰降低和峰前增加(1.0％)。通过所进行的任何其他测定均未观察到变化。

[0491] 在40℃、75％ RH(应力条件)下储存一个月之后(表13),在所有五种制剂中均观察到类似的变化:SE-HPLC主峰降低(0.4％至0.6％,图9A至图9C)、icIEF酸性增加和主峰降低(17.1％至19.8％,图10A至图10C),以及mCE-SDS主峰降低和峰前增加(1.4％至1.9％,图11A和图11B)。在所进行的其他测定中均未观察到变化。

[0492] 此研究的结果表明,莫苏尼妥珠单抗DP在pH 5.5至6.1内保持稳定,即使在高氧化风险条件下(高L-组氨酸、低蔗糖、低L-甲硫氨酸、高聚山梨醇酯)也如此。

[0493]

表 10

制剂筛选 – T_0

制剂	时间（月）	CAC		渗透压	pH	强度	icIEF			SE-HPLC		
		（颜色/外观）	浊度	(mOsm/kg)		(mg/ml)	（% 酸性）	（% 主峰）	（% 碱性）	(% HMWS)	(% 主峰）	(% LMWS)
1（靶标）	T = 0	≤BY7	0.03	286	5.8	1.01	45.3	47.5	7.2	0.9	98.9	0.3
2	T = 0	≤BY7	0.02	203	5.5	1.02	44.3	48.2	7.5	0.8	98.9	0.3
3	T = 0	≤BY7	0.02	201	5.8	0.99	43.7	49.2	7.1	0.8	98.9	0.3
4	T = 0	≤BY7	0.03	195	6.2	0.98	46.4	46.5	7.1	0.8	98.9	0.3
5	T = 0	≤BY7	0.01	203	5.8	1.02	46.2	46.9	6.9	0.8	98.9	0.3

表 6，续

制剂	时间（月）	非还原 CE-SDS		亚可见颗粒（累积计数/ml）						L-Met (mM)	Met 257 氧化 (%)	PS20 (% w/v)
		峰前的总和 (%)	（% 主峰）	可见颗粒物	≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	效价			
1（靶标）	T = 0	4.9	94.8	PFVP	16	7	1	0	103	4.6	2.8	0.06
2	T = 0	4.9	94.8	PFVP	73	26	13	4	106	2.3	2.6	0.08
3	T = 0	4.9	94.8	PFVP	8	3	0	0	113	2.3	2.6	0.08
4	T = 0	4.9	94.8	PFVP	28	3	1	0	102	2.4	2.5	0.08
5	T = 0	4.9	94.8	PFVP	137	25	7	1	109	4.8	2.7	0.08

[0494]

表 11

2°C 至 8°C 的 DP 制剂筛选结果

制剂	时间（月）	颜色	浊度	pH	强度 (mg/ml)	icIEF			SE-HPLC		
						(% 酸性)	(% 主峰)	(% 碱性)	(% HMWS)	(% 主峰)	(% LMWS)
1（靶标）	1	NT	0.01	5.8	NT	45.0	47.8	7.2	0.8	98.9	0.3
	2	≤ BY7	0.02	5.8	NT	47.1	45.4	7.5	0.7	99.0	0.3
	3	≤ BY7	NT	5.8	NT	45.2	47.9	6.9	0.8	98.9	0.4
	6	≤ B9*	0.01	5.8	1.02	44.6	47.0	8.4	0.7	99.0	0.3
	9	NT	0.00	5.9	NT	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	12	≤ B9*	0.01	5.8	NT	45.3	46.7	8.0	0.7	99.0	0.3
2	1	NT	0.00	5.5	NT	43.1	49.3	7.6	0.8	99.0	0.2
	2	≤ BY7	0.02	5.5	NT	45.0	46.6	8.4	0.8	99.0	0.3
	3	≤ BY7	NT	5.5	NT	45.2	47.5	7.3	0.6	99.1	0.3
	6	≤ B9*	0.01	5.5	1.01	45.7	46.2	8.1	0.7	99.0	0.3
	9	NT	0.01	5.5	NT	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	12	≤ B9*	0.01	5.5	NT	43.7	46.7	9.7	0.7	99.0	0.3
3	1	NT	0.01	5.8	NT	44.4	48.2	7.4	0.8	99.0	0.3
	2	≤ BY7	0.01	5.8	NT	45.7	46.7	7.6	0.8	98.9	0.3
	3	≤ BY7	NT	5.8	NT	45.9	47.5	6.6	0.8	99.0	0.3
	6	≤ B9*	0.01	5.8	1.04	45.4	47.3	7.3	0.7	99.0	0.3
	9	NT	0.01	5.8	NT	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	12	≤ B9*	0.01	5.8	NT	45.7	46.3	8.1	0.7	99.0	0.3

[0495]

表 11，续

制剂	时间（月）	颜色	浊度	pH	强度 (mg/ml)	icIEF (% 酸性)	icIEF (% 主峰)	icIEF (% 碱性)	SE-HPLC (% HMWS)	SE-HPLC (% 主峰)	SE-HPLC (% LMWS)
4	1	NT	0.01	6.2	NT	45.1	48.0	6.9	0.8	98.9	0.3
	2	≤ BY7	0.02	6.2	NT	46.8	46.0	7.3	0.8	98.9	0.3
	3	≤ BY7	NT	6.2	NT	46.7	46.4	6.9	0.7	99.0	0.3
	6	≤ B9*	0.01	6.2	1.04	45.7	46.8	7.5	0.7	99.0	0.3
	9	NT	0.01	6.2	NT	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	12	≤ B9*	0.01	6.2	NT	47.1	45.1	7.8	0.8	99.0	0.3
5	1	NT	-0.01	5.7	NT	44.8	48.2	7.0	0.8	98.9	0.3
	2	≤ BY7	0.00	5.8	NT	46.0	46.3	7.7	0.8	99.0	0.2
	3	≤ BY7	NT	5.8	NT	45.5	47.4	7.0	0.8	98.9	0.4
	6	≤ B9*	0.00	5.8	1.02	45.9	46.0	8.1	0.7	99.0	0.3
	9	NT	0.01	5.8	NT	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	12	≤ B9*	0.01	5.8	NT	46.5	45.3	8.2	0.7	99.0	0.3

[0496]

表 11，续：

制剂	时间（月）	非还原 CE-SDS		可见颗粒物	亚可见颗粒（累积计数/ml）				效力 (%)	L-Met (mM)	Met 257 氧化 (%)	PS20 (% w/v)
		峰前的总和 (%)	(% 主峰)		≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm				
1	1	5.1	94.6	PFVP	356	73	9	2	NT	4.9	2.6	0.06
	2	5.0	94.7	PFVP	301	79	8	2	NT	4.5	2.6	0.06
	3	5.0	94.8	PFVP	493	38	7	1	NT	3.9	2.5	0.06
	6	4.9	94.8	PFVP	333	33	3	0	NT	4.8	2.6	0.06
	9	NT	NT	PFVP	479	62	8	2	NT	NT	NT	0.06
	12	5.0	94.7	PFVP	447	58	4	0	102	5.2	2.2	0.06
2	1	5.1	94.6	PFVP	42	13	6	2	NT	2.4	2.8	0.08
	2	4.9	94.9	PFVP	351	68	9	2	NT	2.3	2.6	0.08
	3	5.0	94.7	PFVP	738	163	23	0	NT	1.9	2.5	0.08
	6	4.8	94.8	PFVP	271	73	6	0	NT	2.4	2.6	0.08
	9	NT	NT	PFVP	34	9	3	1	NT	NT	NT	0.08
	12	5.0	94.8	PFVP	787	107	2	0	107	2.6	2.3	0.08
3	1	5.2	94.4	PFVP	202	19	2	0	NT	2.5	2.7	0.08
	2	5.0	94.7	PFVP	435	127	23	4	NT	2.3	2.5	0.08
	3	4.9	94.8	PFVP	593	72	3	1	NT	2.1	2.5	0.08
	6	4.8	94.9	PFVP	427	52	0	0	NT	2.4	2.7	0.08
	9	NT	NT	PFVP	15	4	1	0	NT	NT	NT	0.08
	12	5.0	94.7	PFVP	25	4	1	0	100	2.6	2.3	0.08

[0497]

表 11，续

制剂	时间（月）	非还原 CE-SDS			亚可见颗粒（累积计数/ml）				L-Met		PS20
		峰前的总和 (%)	（% 主峰）	可见颗粒物	≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	效力 (%)	(mM)	Met 257 氧化 (%)	(% w/v)
4	1	5.1	94.5	PFVP	395	67	13	2	NT	2.6	2.6	0.08
	2	5.0	94.8	PFVP	242	38	3	0	NT	2.3	2.8	0.08
	3	4.9	94.8	PFVP	242	27	4	1	NT	2.2	2.5	0.08
	6	4.8	94.8	PFVP	755	135	15	0	NT	2.4	2.6	0.08
	9	NT	NT	PFVP	143	12	2	0	NT	NT	NT	0.08
	12	5.1	94.4	PFVP	733	60	3	0	93	2.6	2.3	0.08
5	1	5.2	94.4	PFVP	377	88	12	0	NT	4.8	2.6	0.08
	2	5.0	94.8	PFVP	370	112	25	1	NT	4.5	2.6	0.08
	3	4.9	94.8	PFVP	199	58	11	1	NT	4.0	2.5	0.08
	6	4.8	94.9	PFVP	351	48	5	0	NT	4.9	2.7	0.08
	9	NT	NT	PFVP	1047	148	2	0	NT	NT	NT	0.08
	12	4.9	94.8	PFVP	229	20	0	0	2.2	0.08	4.9	94.8

[0498]

表 12

25°C/60% RH 下的 DP 制剂筛选结果

制剂	时间（月）	颜色	浊度	pH	强度 (mg/ml)	icIEF			SE-HPLC		
						(% 酸性)	(% 主峰)	(% 碱性)	(% HMWS)	(% 主峰)	(% LMWS)
1	0.5	NT	NT	5.8	NT	45.7	47.4	6.9	0.8	99.0	0.3
	1	NT	0.02	5.8	NT	46.3	47.1	6.6	0.7	99.0	0.3
	2	NT	-0.01	5.8	NT	50.1	42.1	7.8	0.7	98.9	0.4
	3	NT	0.01	5.8	NT	51.9	41.6	6.5	0.7	98.9	0.5
	6	≤ B9*	0.00	5.8	1.04	57.9	35.3	6.8	0.8	98.6	0.7
2	0.5	NT	NT	5.5	NT	44.7	47.9	7.4	0.7	99.0	0.3
	1	NT	0.03	5.5	NT	45.8	47.5	6.8	0.7	98.9	0.4
	2	NT	0.02	5.5	NT	50.3	41.9	7.7	0.8	98.9	0.4
	3	NT	0.00	5.5	NT	51.6	41.9	6.6	0.7	98.8	0.5
	6	≤ B9*	0.01	5.5	1.04	57.3	35.1	7.6	0.8	98.5	0.7
3	0.5	NT	NT	5.8	NT	45.2	47.9	6.9	0.7	99.0	0.3
	1	NT	0.07	5.7	NT	46.6	47.0	6.5	0.7	99.0	0.3
	2	NT	0.00	5.8	NT	50.3	42.2	7.5	0.8	98.9	0.4
	3	NT	0.00	5.8	NT	53.4	39.9	6.7	0.6	98.9	0.5
	6	≤ B9*	0.00	5.8	1.04	60.3	33.3	6.4	0.8	98.5	0.7

[0499]

表 12，续

制剂	时间（月）	颜色	浊度	pH	强度 (mg/ml)	icIEF			SE-HPLC		
						(% 酸性)	(% 主峰)	(% 碱性)	(% HMWS)	(% 主峰)	(% LMWS)
4	0.5	NT	NT	6.2	NT	46.8	46.6	6.6	0.7	99.0	0.3
	1	NT	0.05	6.2	NT	47.3	46.3	6.4	0.7	98.9	0.3
	2	NT	0.01	6.2	NT	52.5	40.3	7.2	0.7	98.9	0.4
	3	NT	0.01	6.2	NT	56.0	38.0	6.0	0.7	98.8	0.5
	6	≤B9*	0.00	6.2	1.04	63.4	30.4	6.2	0.8	98.5	0.7
5	0.5	NT	NT	5.8	NT	45.1	47.8	7.2	0.8	99.0	0.3
	1	NT	0.04	5.8	NT	47.6	45.7	6.8	0.7	98.9	0.3
	2	NT	-0.01	5.8	NT	50.2	42.6	7.2	0.8	98.9	0.4
	3	NT	0.01	5.8	NT	52.7	41.8	5.6	0.7	98.8	0.6
	6	≤B9*	0.01	5.8	1.04	59.1	35.0	5.9	0.8	98.5	0.7

[0500]

表 12，续

制剂	时间（月）	非还原 CE-SDS		亚可见颗粒（累积计数/ml）				效力	L-Met	Met257 氧化	PS20
		峰前的总和 (%)	(% 主峰)	可见颗粒物	≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	(%)	(mM)	(%)	(% w/v)
1	0.5	5.0	94.7	PFVP	133	30	5	0	NT	4.8	2.7	0.06
	1	5.1	94.6	PFVP	286	48	8	0	NT	4.8	2.6	0.06
	2	5.1	94.7	PFVP	675	150	26	0	NT	4.5	2.7	0.06
	3	5.3	94.5	PFVP	230	43	7	0	NT	3.8	2.5	0.06
	6	5.8	94.0	PFVP	39	6	2	0	88	4.6	2.7	0.06
2	0.5	5.0	94.7	PFVP	42	13	6	2	NT	2.4	2.8	0.08
	1	5.2	94.5	PFVP	351	68	9	2	NT	2.4	2.8	0.08
	2	5.3	94.5	PFVP	738	163	23	0	NT	2.3	2.6	0.08
	3	5.4	94.3	PFVP	366	64	18	0	NT	2.0	2.6	0.08
	6	5.8	94.0	PFVP	217	73	8	0	86	2.4	2.7	0.08
3	0.5	4.9	94.8	PFVP	268	89	22	0	NT	2.5	2.8	0.08
	1	5.1	94.6	PFVP	45	14	3	0	NT	2.4	3.0	0.08
	2	5.2	94.6	PFVP	395	101	23	2	NT	2.4	2.8	0.08
	3	5.4	94.4	PFVP	355	80	8	0	NT	1.7	2.7	0.08
	6	5.8	94.0	PFVP	409	78	11	0	93	2.4	2.9	0.08

[0501]

表 12，续

制剂	时间（月）	非还原 CE-SDS		亚可见颗粒（累积计数/ml）				效力	L-Met	Met257 氧化	PS20
		峰前的总和（%）	（% 主峰）	可见颗粒物	≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	(%)	(mM)	(%)	(% w/v)
4	0.5	5.0	94.8	PFVP	98	40	6	0	NT	2.5	2.9	0.08
	1	5.0	94.7	PFVP	36	8	2	0	NT	2.5	2.7	0.08
	2	5.1	94.7	PFVP	653	148	20	0	NT	2.3	2.6	0.08
	3	5.3	94.5	PFVP	578	128	23	0	NT	1.9	2.6	0.08
	6	5.8	94.0	PFVP	77	18	3	0	79	2.4	2.9	0.08
5	0.5	5.0	94.7	PFVP	243	78	21	1	NT	5.2	2.7	0.08
	1	5.1	94.7	PFVP	194	37	3	0	NT	4.9	2.7	0.08
	2	5.2	94.6	PFVP	448	118	28	0	NT	4.5	2.6	0.08
	3	5.4	94.4	PFVP	333	104	14	0	NT	4.1	2.6	0.08
	6	4.8	94.8	PFVP	335	79	12	0	82	4.8	2.7	0.08

[0502]

表 13

40 °C/75% RH 下的 DP 制剂筛选结果

制剂	时间（月）	颜色	浊度	pH	icIEF			SE-HPLC	
					（% 酸性）	（% 主峰）	（% 碱性）	(% HMWS)	（% 主峰）	(% LMWS)
1	0.1	NT	NT	5.8	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	0.25	NT	NT	5.8	47.7	45.5	6.8	0.7	99.0	0.3
	0.5	NT	NT	5.8	52.2	41.5	6.4	0.7	98.8	0.5
	0.75	NT	NT	5.8	56.2	37.8	6.0	0.7	98.7	0.6
	1	≤ BY7	0.01	5.8	62.3	32.7	5.0	0.8	98.5	0.7
2	0.1	NT	NT	5.5	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	0.25	NT	NT	5.5	48.3	44.2	7.4	0.8	98.9	0.3
	0.5	NT	NT	5.5	52.1	41.1	6.8	0.8	98.8	0.5
	0.75	NT	NT	5.5	56.5	37.2	6.4	0.8	98.6	0.6
	1	≤ BY7	0.01	5.5	61.9	32.8	5.4	0.8	98.4	0.8
3	0.1	NT	NT	5.8	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	0.25	NT	NT	5.8	48.8	44.5	6.7	0.8	98.9	0.4
	0.5	NT	NT	5.8	52.3	40.8	6.9	0.7	98.8	0.4
	0.75	NT	NT	5.7	57.8	36.4	5.8	0.8	98.6	0.6
	1	≤ BY7	0.00	5.7	63.5	31.5	4.9	0.9	98.3	0.8

[0503]

表 13，续

制剂	时间（月）				icIEF			SE-HPLC		
		颜色	浊度	pH	（% 酸性）	（% 主峰）	（% 碱性）	（% HMWS）	（% 主峰）	（% LMWS）
4	0.1	NT	NT	6.2	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	0.25	NT	NT	6.2	50.0	43.5	6.5	0.7	98.9	0.3
	0.5	NT	NT	6.2	54.6	39.3	6.1	0.8	98.8	0.5
	0.75	NT	NT	6.2	59.8	34.7	5.5	0.7	98.7	0.6
	1	≤BY7	0.01	6.2	66.0	29.3	4.6	0.7	98.5	0.8
5	0.1	NT	NT	5.8	NT	NT	NT	0.7	99.0	0.3
	0.25	NT	NT	5.8	48.9	44.3	6.8	0.8	98.9	0.4
	0.5	NT	NT	5.8	53.1	40.4	6.6	0.8	98.8	0.5
	0.75	NT	NT	5.8	57.4	36.9	5.7	0.8	98.7	0.6
	1	≤BY7	0.00	5.8	63.4	31.6	5.0	0.8	98.5	0.7

[0504]

表 13，续

制剂	时间（月）	非还原 CE-SDS		可见颗粒物	亚可见颗粒（累积计数/ml）				效力 (%)	L-Met (mM)	Met257 氧化 (%)	PS20 (% w/v)
		峰前的总和 (%)	（% 主峰）		≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm				
1	0.1	NT	NT	PFVP	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.06
	0.25	5.1	94.7	PFVP	38	6	0	0	NT	4.8	2.6	0.06
	0.5	5.4	94.3	PFVP	344	83	23	0	NT	4.9	2.7	0.06
	0.75	5.8	93.9	PFVP	26	3	0	0	NT	5.0	2.7	0.06
	1	6.5	93.3	PFVP	16	3	1	0	82	5.1	2.7	0.06
2	0.1	NT	NT	PFVP	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.08
	0.25	5.2	94.6	PFVP	296	80	12	0	NT	2.4	2.7	0.08
	0.5	5.6	94.2	PFVP	411	99	25	0	NT	2.5	2.9	0.08
	0.75	6.1	93.6	PFVP	928	273	38	0	NT	2.5	2.8	0.08
	1	6.8	92.9	PFVP	133	55	11	0	90	2.4	2.8	0.08
3	0.1	NT	NT	PFVP	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.08
	0.25	5.1	94.9	PFVP	31	8	1	0	NT	2.4	NR	0.08
	0.5	5.5	94.5	PFVP	172	46	18	0	NT	2.5	2.8	0.08
	0.75	6.0	94.0	PFVP	403	93	9	0	NT	2.6	2.8	0.08
	1	6.7	93.4	PFVP	167	59	8	0	101	2.4	2.9	0.08

[0505]

制剂	时间（月）	非还原 CE-SDS		可见颗粒物	亚可见颗粒（累积计数/ml）				效力 (%)	L-Met (mM)	Met257 氧化 (%)	PS20 (% w/v)
		峰前的总和 (%)	(% 主峰)		≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm				
4	0.1	NT	NT	PFVP	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.08
	0.25	4.9	94.9	PFVP	123	44	4	0	NT	2.5	2.8	0.08
	0.5	5.3	94.5	PFVP	246	60	12	2	NT	2.5	2.9	0.08
	0.75	5.8	94.0	PFVP	489	114	9	0	NT	2.5	2.7	0.08
	1	6.3	93.4	PFVP	61	18	1	0	79	2.4	2.9	0.08
5	0.1	NT	NT	PFVP	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.08
	0.25	5.1	94.6	PFVP	237	60	8	0	NT	4.9	2.7	0.09
	0.5	5.4	94.3	PFVP	312	68	20	0	NT	5.0	2.8	0.08
	0.75	6.0	93.8	PFVP	322	124	27	0	NT	4.9	2.9	0.08
	1	6.6	93.1	PFVP	105	36	8	0	99	4.8	2.8	0.08

[0506] 3.6DS制剂筛选

[0507] 在不锈钢微型罐中评定DS稳定性。样品包括目标制剂(制剂1)、制剂2和制剂3,其

具有表14所示的组成。所有制剂均含有10mg/ml莫苏尼妥珠单抗和0.06％(w/v)PS20。在这些实例中,表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约7。制剂2和3分别为相对低pH和高pH下氧化的高风险制剂。通过在具有各种灌装体积的表面磨损的微型罐中孵育DS来评定金属可浸出物加速蛋白质氧化的风险,以对顶部空间的影响进行定量。

[0508]

表 14

DS 制剂总结

制剂	组氨酸乙酸盐 (mM)	pH	蔗糖 (mM)	甲硫氨酸 (mM)
1（靶标）	10	5.8	240	5
2	15	5.5	160	2.5
3	15	6.1	160	2.5

[0509] 每种制剂均被无菌过滤并灌装到316L 25ml不锈钢微型罐中,灌装体积为15ml。将微型罐在实时(-20℃)、加速(2℃至8℃)、应力(25℃,60％相对湿度;RH)条件下并选择性地在-40℃稳定地直立储存。将微型罐在冷冻条件下储存,经历不超过三个冻融循环。为了控制微型罐可变性,在大多数温度条件下稳定地放置两个罐。

[0510] 为测试金属可浸出物所诱导的蛋白质氧化,总共选择四个表现出表面磨损(凹痕、刮痕等)的45ml微型罐,并用低pH制剂(pH 5.5)(认为其蛋白质氧化风险高)灌装。将这些微型罐在2℃至8℃和25℃、60％ RH下稳定地放置(在每个温度下放置两个微型罐)。DS灌装体积随微型罐中的高灌装体积(40ml)和低灌装体积(15ml)而变化,以生成顶部空间的可变性。

[0511] 进行测定以观察pH、氧化(通过肽图分析)、尺寸变化(通过SE-HPLC)、电荷变体(通过mCE-SDS和iCIEF)、颜色和外观、亚可见颗粒(通过HIAC)、可见颗粒、浓度(通过UV-Spec扫描)、浊度、效力和PS20浓度(通过ELSD)。未观察到在-40℃或-20℃储存12个月之后测试的任何制剂有任何变化,并且未观察到在5℃储存六个月之后测试的任何制剂有任何变化。表面磨损的45ml微型罐中的高灌装体积和低灌装体积样品与5℃储存在25ml微型罐中的样品相比未显示出差异。

[0512] 总之,莫苏尼妥珠单抗DS在pH 5.5至6.1内保持稳定,即使在高氧化风险制剂的氧化配制条件下(用于氧化评估的高浓度His和低浓度Met,用于冷冻稳定性评估的低浓度蔗糖)和挑战金属可浸出物所诱导的氧化时(表面磨损的微型罐中的低灌装体积)也如此。因此,这些数据表明,此类组合物(例如,具有高浓度His、低浓度Met和低浓度蔗糖的组合物)也可与高达约10mg/ml的蛋白质水平(在一些DS制剂中为必需的)一起使用。

[0513] 3.7DS制剂稳定性确认研究(另外的制剂)

[0514] 测试另外的DS制剂以评定低组氨酸浓度和高Met浓度是否对DS稳定性具有影响。先前尚未针对低于10mM目标值的乙酸组氨酸浓度或高于10mM的甲硫氨酸浓度测试稳定性。制剂显示于下表15中。所有制剂均含有10mg/ml莫苏尼妥珠单抗和0.06％(w/v)PS20。在这些制剂中,表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约7。

[0515]

表 15

DS 制剂稳定性确认研究（另外的制剂）

制剂	组氨酸乙酸盐 (mM)	pH	蔗糖 (mM)	甲硫氨酸 (mM)
1（靶标）	10	5.8	240	10
2	5	5.8	240	15

[0516] 每种制剂均被无菌过滤并灌装到316L 25ml不锈钢微型罐中,灌装体积为16ml。将微型罐在加速(2℃至8℃)和应力(25℃/60％RH)下稳定地直立储存。为了控制微型罐可变性,稳定地放置两个罐。

[0517] 进行测定以测试pH、氧化(通过肽图分析)、甲硫氨酸浓度、效力、尺寸变体(通过SE-HPLC)、电荷变体(通过mCE-SDS和iCIEF)、颜色和外观、可见颗粒、浓度(通过UV-Spec扫描)、浊度和PS20浓度(ELSD)。

[0518] 在5℃储存一个月之后,在任何测试的制剂中均未观察到变化。高浓度甲硫氨酸和低浓度组氨酸制剂与目标样品相比未显示出差异。在25℃储存一个月之后,观察到两种DS制剂出现一致的变化,即,通过SE-HPLC(0.2％)和CE-SDS确定的LMWS略有增加,以及通过icIEF确定的主峰降低和酸性峰增加。在其他测定中未观察到变化。此研究表明,莫苏尼妥珠单抗DS在10mM至15mM的甲硫氨酸浓度范围和5mM至10mM的组氨酸乙酸盐浓度范围内保持稳定。

[0519] 3.8DS冻融稳定性

[0520] 通过在微型罐中用七个冻融循环对表10中指定的每种制剂进行应力处理来评估DS的冻融稳定性。向25ml 316L不锈钢微型罐中灌装16ml无菌过滤材料。为每种制剂分别准备一个微型罐。冻融循环由以下条件组成:在-40℃两小时,然后在-20℃至少8小时,然后在室温储存,直至样品完全解冻(大约2至3小时)。取样之前,通过将罐轻轻倒置大约十次来混合材料。在第三、第四、第五和第七循环之后,对每个微型罐无菌取样2.5ml。

[0521] 对亚可见颗粒(HIAC)、可见颗粒、浊度(UV spec)、氧化(肽图)和大小(SE-HPLC)进行测定。如表16所示,未观察到变化。这些数据确认,DS在七个冻融循环中保持稳定。

[0522]

表 16

DS 制剂筛选样品的冻融稳定性

	冻融循环	颜色	浊度	氧化 (%Met257)	SE-HPLC (% HMWS)	SE-HPLC (% 主峰)	SE-HPLC (% LMWS)	可见颗粒	亚可见颗粒（累积计数/ml） ≥2 μm	≥5 μm	≥10 μm	≥25 μm
1（靶标）	0	≤BY7	0.05	2.8	1.0	98.7	0.3	PFVP	33	8	3	0
	3	≤BY7	0.07	NT	1.0	98.7	0.3	PFVP	19	9	8	2
	4	≤BY7	0.05	NT	1.0	98.8	0.3	PFVP	240	83	40	1
	5	≤BY7	0.05	NT	1.0	98.8	0.3	PFVP	317	90	37	2
	7	≤BY7	0.03	2.8	1.0	98.8	0.3	PFVP	543	150	49	2
2	0	≤BY7	0.05	2.8	0.9	98.8	0.3	PFVP	14	8	8	3
	3	≤BY7	0.04	NT	1.0	98.8	0.3	PFVP	165	50	22	4
	4	≤BY7	0.07	NT	1.0	98.7	0.3	PFVP	353	117	44	2
	5	≤BY7	0.05	NT	0.9	98.8	0.3	PFVP	532	162	73	3
	7	≤BY7	0.03	2.8	1.0	98.8	0.3	PFVP	806	252	73	4
3	0	≤BY7	0.05	2.8	1.0	98.7	0.3	PFVP	23	3	1	0
	3	≤BY7	0.04	NT	1.0	98.7	0.3	PFVP	132	20	3	0
	4	≤BY7	0.04	NT	1.0	98.7	0.3	PFVP	181	55	15	0
	5	≤BY7	0.02	NT	1.0	98.7	0.3	PFVP	403	123	33	1
	7	≤BY7	0.04	2.8	1.0	98.8	0.2	PFVP	643	210	67	2

[0523] 3.9道南效应

[0524] 通过测量在渗滤(DF)期间从每个体积倍数(diavolume)中取出的过程中样品的pH

来评定道南效应(半透膜两侧的渗透带电离子的不均匀分布,其在存在不透性带电离子的情况下发生)。还测量DF缓冲液、调节缓冲液、经回收的池、经稀释的池和经调节的材料的pH。使用UPLC分析测量选定样品的LSPD中的L-组氨酸浓度,进行游离组氨酸测定。

[0525] 实验的结果汇总于图12中。在约50g/L的蛋白质浓度下,在经回收的池中观察到pH增加约0.2(相对于DF缓冲液pH 5.8)的道南效应。使用5倍稀释因数,在稀释并调节至10g/L的蛋白质浓度之后,pH返回至pH 5.8的目标值。经稀释的池和经调节的池中的组氨酸浓度为大约10mM。

[0526] 实例4:基于莫苏尼妥珠单抗制剂开发的组分选择

[0527] 以上实例3中描述的制剂开发研究为如下所述的各种组分(例如,蛋白质、表面活性剂、抗氧化剂、缓冲液、pH、蔗糖和容器)的选择提供了信息。

[0528] 4.1.蛋白质

[0529] 选择蛋白质浓度以在不使用稀释剂的情况下经由IV袋准确地递送III期剂量。第一天分次剂量预计低至0.8mg至1.0mg。实例3.1的IV袋振摇研究表明,为递送此类低剂量,需要低DP蛋白质浓度,以确保稀释剂量溶液中有足够的表面活性剂以保护蛋白质免受机械搅拌的影响。此外,较低的蛋白质浓度允许更大的给药体积,并因此实现更准确的剂量递送。出于这些原因,选择DP蛋白质浓度为1mg/ml。选择DS浓度为10mg/ml,以平衡从DS到DP的合理稀释因数和适合DS储存的设施。

[0530] 4.2.表面活性剂

[0531] 对三种表面活性剂类型进行评估:PS20、超精制PS20(srPS20)和P188。将SrPS20排除在外,因为其增加了在低蛋白质浓度制剂中诱导蛋白质氧化、片段化和聚集的风险(实例3.2)。由IV袋搅拌研究(实例3.1)确定PS20和P188所需的最低水平分别为0.05%(w/v)和0.08%(w/v)。PS20和P188两者均显示在热应力下对蛋白质质量无影响(实例3.2)。鉴于所需的浓度相对较低,由于蛋白质浓度低(且因此,任何脂肪酶杂质丰度较低)导致酯键水解风险低,且由于包括抗氧化剂而导致表面活性剂氧化风险低,选择PS20作为表面活性剂类型。基于由IV袋振摇研究(实例3.1)确定的最低所需水平,选择0.06%(w/v)作为PS20目标浓度(对于含有1mg/ml莫苏尼妥珠单抗的制剂,表面活性剂与莫苏尼妥珠单抗的摩尔比为约71,并将0.05%至0.07%(w/v)确定为PS20的DS释放规格。

[0532] 4.3.抗氧化剂

[0533] 在知识建构研究中,将氧化确定为莫苏尼妥珠单抗的低蛋白质浓度制剂的主要风险,并且L-Met保护制剂免受氧化的影响。在制剂开发期间,认为氧化是评估的主要风险,并在热应力和环境光应力条件下挑战最差情况制剂的氧化(实例3.3)。这些研究表明Met是必需的,而NAT未对光应力所诱导的氧化增加额外的益处。

[0534] 在使用热应力的过氧化氢加标研究中对Met浓度进行优化(实例3.4)。在该应力模型中,需要5mM Met才能完全保护制剂免受蛋白质氧化的影响。添加过氧化氢之后立即进行Met所介导的氧化淬灭有益于制剂稳定性,因为鉴于汽化过氧化氢是设备(诸如隔离器)的常用灭菌试剂,DS和DP在制造过程期间可能发生残留过氧化氢挑战。为确保DS和DP制剂对于来自多种来源的氧化应力的稳定性,并考虑到Met浓度的制造可变性,选择10mM作为DS和DP制剂中的Met浓度。

[0535] 4.4.缓冲液

[0536] 使用组氨酸乙酸盐(His)作为制剂1中的缓冲物质,并证明其在pH5.5至6.1下缓冲DS和DP制剂的能力。因此,选择His作为制剂的缓冲物质。知识建构研究表明,在10mM至30mM范围内,His浓度对酸性峰形成有积极影响。进一步的研究表明,在不存在抗氧化剂的情况下,与含有30mM His的制剂相比,含有10mM His的制剂不易氧化(实例3.3)。His浓度为10mM和更低(例如,5mM)时,足以在pH 5.5至6.1下缓冲DS和DP溶液。确认pH在含有10mM His的制剂中的长期实时、加速和应力稳定性方面保持稳定(实例3.5和3.6)。从制造角度来看,鉴于在道南效应评估中观察到pH偏移(实例3.8),His浓度可能在50g/L的经回收的池中偏移。然而,鉴于从经回收的池到经稀释的池(12.5g/L)和DS(10g/L)的高稀释因数,将His浓度恢复至接近10mM。因此,道南效应对最终DS和DP His浓度的影响极小。考虑到所有这些因素,选择10mM组氨酸乙酸盐作为目标缓冲液浓度。

[0537] 4.5.pH

[0538] 早期制剂的长期稳定性研究表明目标pH 5.8足以保证稳定性。知识建构研究表明,pH对酸性峰形成具有较小的积极影响,并且对聚集或片段化无影响。针对目标制剂和高风险氧化制剂的DP和DS筛选研究表明,pH(5.5至6.1)对实时、加速和应力稳定性的影响极小(实例3.5和3.6)。基于这些结果,将制剂pH选择为pH 5.8。

[0539] 4.6.蔗糖

[0540] 早期制剂包括240mM蔗糖用于调节张度以适应皮下施用。当将高风险氧化制剂排除在统计分析之外时,知识建构研究未显示蔗糖浓度对产品质量属性有任何显著影响。在DP和DS筛选研究以及DS的多个冻融研究中评估相对低浓度的蔗糖(160mM),并且与目标制剂进行比较时,显示对稳定性无影响(实例3.5、3.6和3.7)。

[0541] 4.7.容器

[0542] 在DS制剂筛选中使用316L不锈钢微型罐。多个冻融研究表明其具有足够稳定性(实例3.6和3.7)。将不锈钢视为金属可浸出物诱导的蛋白质降解风险高的容器(例如,与HASTELLOY®相比)。这些结果表明,DS制剂在不锈钢和HASTELLOY®中保持稳定。316L不锈钢和HASTELLOY®微型罐将在DS代表性研究中进行评估,以为允许使用任一类型的容器进行DS储存提供额外的支持数据。

[0543] 根据两步分次给药方案,DP小瓶构造必须支持在临床试验中递各种剂量,该方案需要两个低分次剂量(例如,1mg和2mg)和一个全剂量(例如,5mg至20mg)。为最好地支持该剂量范围,选择标称灌装量为13.5ml的20ml小瓶。

[0544] 实例5:格菲妥单抗计算机仿真分析

[0545] RO7082859/格菲妥单抗为T细胞双特异性人源化单克隆抗体(TCB),其与肿瘤细胞上的人类CD20和T细胞上的T细胞受体复合体(TCR)的人类CD3ε亚基(CD3ε)结合。它有两条不同的重链和两条不同的轻链构成。CH3结构域中的点突变(“杵-臼”)促进两条不同的重链的组装。CD3结合Fab中VH和VL结构域的交换(“CrossMab方法”)和CD20结合Fab中CH和CL结构域中的点突变(“带电变体”)促进两条不同的轻链与相对应的重链的正确组装。“杵-臼”突变由重链HC1中的氨基交换Y349C、T366S、L368A和Y407V以及重链HC2中的氨基交换S354C和T366W(Kabat EU索引编号)组成。“带电变体”突变由轻链LC2中的氨基酸交换E123R和Q124K(Kabat编号)以及重链HC1和HC2中的K147E和K213E(Kabat EU索引编号)组成。

[0546] 与人类CD20的结合以高亲和力和二价结合模式发生,而与CD3ε的结合是单价的和

低亲和力结合。RO7082859为人类IgG1,其Fc区带有修饰(“PG LALA”突变),该修饰在体外消除其与Fc γ受体(Fc γR)的结合,并阻止Fc γR所介导的先天免疫效应细胞(包括自然杀伤细胞(NK)细胞、/单核细胞/巨噬细胞和中性粒细胞)的共活化,而与FcRn(新生儿Fc受体)的功能结合则无变化。“PG LALA”突变由重链HC1和重链HC2中的氨基酸交换P329G、L234A和L235A组成(“PG LALA”,Kabat EU索引编号)。

[0547] 重组抗体产生于CHO细胞中,并由两条重链(分别为449和674个氨基酸残基)和三条轻链(分别为232和219(两个拷贝)氨基酸残基)组成,以非对称构造排列,如图13所示。

[0548] 活性热点总结

[0549] 对于分子的CD3结合部分,计算机仿真预测指示重链的CDR3中有2个易于降解的Asn残基和1个暴露的Trp残基。在14天的应力实验中,在pH 6.0下孵育后未观察到靶标结合活性的显著变化,但在生理pH(PBS pH 7.4,数据未示出)下孵育之后观察到靶标结合活性的大幅损失。

[0550] 实例6:格菲妥单抗制剂开发GLP Tox和进入人体研究

[0551] 根据表17中显示的方案进行筛选。在筛选期间,使制剂暴露于以下条件:储存3周和6周(在5℃、25℃和40℃),在5℃和25℃振摇1周和F/T(5个循环)。然后对指定的制剂随访长达52周。

[0552] 表17:适应平台筛选研究设计与制剂编码

[0553]

制剂	蛋白质浓度 (mg/ml)	缓冲液	pH	赋形剂 1	赋形剂 2	表面活性剂
F1	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM 蔗糖	10 mM 甲硫氨酸	0.05 (w/v)% PS20
F2	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM 蔗糖	-	0.05 (w/v)% PS20
F3	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM 蔗糖	10 mM 甲硫氨酸	0.05 (w/v)% Px188
F4	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM 蔗糖	-	0.05 (w/v)% Px188
F5	5	20 mM His/His-Cl	6.0	240 mM 蔗糖	10 mM 甲硫氨酸	0.05 (w/v)% PS20

[0554] 在5℃、25℃和40℃储存6周之后,所有制剂在大多数测试的物理性质(即可见颗粒和亚可见颗粒、颜色、浊度、pH和蛋白质含量)方面均无显著变化。CE-SDS数据未示出,因为它对指定并不重要。

[0555] 通过Seidenader方法进行的可见颗粒分析表明,在所有储存条件下,任何一种制剂均未形成可见颗粒。亚可见颗粒计数低(未示出)。在机械应力条件下,F2至F5在5℃和25℃均显示出许多颗粒。F1在两种条件下均不含颗粒。使用EP和Optima,除F3和F4(均具有P188)显示出颗粒但低于限值(未示出)外,所有组合物均几乎不含颗粒(0个颗粒)。在5℃振摇下,F3(P188+Met)中的亚可见颗粒明显差于F4(P188),所有其他制剂在每种条件下均具有相似的计数(未示出)。

[0556] 6周之后,所有制剂在所有条件下的浊度和颜色均无显著变化。表面活性剂含量在

5℃和25℃保持稳定,并且对于两种含有P188的制剂(F3、F4),表面活性剂含量在40℃也保持稳定。对于所有含有PS20的活性制剂(F1、F2和F5),在40℃观察到表面活性剂含量的损失,与制剂是否含有甲硫氨酸无关。

[0557] 甲硫氨酸的有益效果仅见于含有PS20的安慰剂制剂中,其中仅P2的PS含量在40℃时有所下降(图14)。生化表征表明制剂仅在40℃储存之后存在差异。

[0558] 在尺寸排阻色谱(SEC)中,F2和F5的单体损失更明显,与HMW面积的增加相关。可观察到出现一种新的HMW(高分子量)物质,其在F3和F4中仅为次要物质,在F1中较强,并在F2和F5中占主导地位。发现LMW(低分子量)物质在所有制剂中以大致相同的速率增加(图15)。在离子交换色谱(IEC)中可观察到类似的趋势,碱性峰面积总体增加,并且酸性峰面积的增加在F2和F5中更明显(图16)。

[0559] 总之,数据明确排除F2和F5,并显示F1、F3和F4同样稳定,未明显偏向三者中的任何一者。指定F1(20mM His/His-Cl,pH 5.5,240mM蔗糖,10mM甲硫氨酸,0.05(w/v)%PS20)。F1的所有分析结果的总结可见于图17中。

[0560] 实例7:格菲妥单抗GLP Tox/进入人体研究

[0561] 通过Biacore结合

[0562] 上述纯度结果还反映在F2和F5在40℃时的CD20结合损失,以及这些制剂中高达50%的CD3结合的显著损失,相比之下,剩余制剂的损失在10%至20%之间(图18A和图18B)。

[0563] 实例8:针对格菲妥单抗的III期和商业制剂的开发研究

[0564] 该实例提供格菲妥单抗制剂的药物开发的概述。作为这一开发的结果,格菲妥单抗药物产品作为IV供输注的溶液的无菌液体浓缩物提供。该药物产品由含1mg/ml格菲妥单抗的20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐(HCl)缓冲液、240mM蔗糖、10mM L-甲硫氨酸、0.5mg/ml聚山梨醇酯20(pH 5.5)构成。格菲妥单抗为原料药和药物产品中的唯一活性成分。制剂开发研究确定该剂型和制剂适用于预期用途。该制剂足够稳健以确保药物产品在制造、储存、运输和施用期间保持稳定。

[0565] 测试具有更高蛋白质浓度(例如5mg/ml、25mg/ml或50mg/ml格菲妥单抗)的制剂,但由于PS20降解导致可见颗粒和亚可见颗粒形成,因此未进行研究。游离脂肪酸(月桂酸和肉豆蔻酸)的释放水平随蛋白质浓度的增加而增加,确认亚可见颗粒和可见颗粒形成的根本原因为水解PS20降解。

[0566] 选择液体剂型,其能够减少处理步骤,同时确保在制造期间和药物产品保质期结束时的产品质量。

[0567] 格菲妥单抗药物产品将以两种强度在两种小瓶构造中商购获得:以2.5mg/瓶灌装到6ml一次性玻璃小瓶中,以10mg/瓶灌装到15ml一次性玻璃小瓶中,以匹配所需的2.5mg、10mg和30mg临床剂量,同时使产品耗损最小化。对于商业药物产品制剂,将格菲妥单抗的浓度降低至1mg/ml,同时保持赋形剂组成不变。

[0568] 制剂开发研究为选择用于药物产品的适当剂型、蛋白质浓度、表面活性剂浓度、缓冲剂种类、溶液pH、稳定剂、张度剂和小瓶构造提供了依据。原料药制剂经优化,以考虑设施适合、稀释和储存考虑因素。

[0569] 剂型的选择

[0570] 选择液体剂型以提供供输注的溶液的浓缩物,需要较少的处理步骤,同时确保在制造期间和药物产品保质期结束时的产品质量。

[0571] 蛋白质浓度的选择

[0572] 为I期选择5mg/ml的蛋白质浓度,并保留直至III期。基于制剂开发研究和更新的临床剂量要求,随后选择1mg/ml的蛋白质浓度作为商业制剂。

[0573] 在1mg/ml、5mg/ml和25mg/ml的格菲妥单抗浓度下,对含有20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐、10mM L-甲硫氨酸、240mM D-蔗糖和0.5mg/ml聚山梨醇酯20(PS20)(在pH 5.5下)的制剂的稳定性进行测试,以便准备使蛋白质浓度适应临床需要。在初始时间点(T0)、若干中间时间点和研究结束时在2℃至8℃储存104周之后,通过SE-HPLC和IE-HPLC评定格菲妥单抗的纯度,对这些制剂的PS20含量和可见/亚可见颗粒形成进行评估。

[0574] 在整个研究中,通过SE-HPLC和IE-HPLC所评定的纯度在1mg/ml与5mg/ml制剂之间相当(图19A和图19B)。亚可见颗粒计数也相当。此外,与5mg/ml和25mg/ml制剂相比,1mg/ml制剂未表现出超出方法可变性的PS20降解(图23,还见下文,聚山梨醇酯20降解的评定)。基于这些结果和2.5mg、10mg和30mg的更新临床剂量方案,选择1mg/ml制剂作为商业制剂。

[0575] 在随后的多变量制剂稳健性研究中进一步评定0.9mg/ml至1.1mg/ml蛋白质的浓度范围(参见实例9,制剂稳健性研究)。该研究确认在此浓度范围内具有可接受的稳定性行为。

[0576] pH、缓冲液、稳定剂和张度剂的选择

[0577] 基于制剂开发研究,选择pH 5.5下的20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐溶液作为缓冲液,组合10mM L-甲硫氨酸作为稳定剂并将240mM D-蔗糖作为张度剂,用于I期制剂并保留用于III期和商业制剂。

[0578] 设定5mg/ml格菲妥单抗的研究以测试20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐缓冲液的pH范围5.5至6.0以及L-甲硫氨酸水平0mM和10mM。另外,对240mM D-蔗糖与130mM氯化钠进行比较。

[0579] 在初始时间点(T0)和在40℃储存6周之后,通过SE-HPLC和IE-HPLC评定格菲妥单抗的纯度以及可见/亚可见颗粒形成,来评估pH和稳定剂的影响。在初始时间点(T0)和在25℃储存26周之后,通过SE-HPLC、IE-HPLC测量并确定可见颗粒/亚可见颗粒形成,来评定张度剂的选择。与pH 6下的不添加稳定剂或20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐缓冲液/10mM L-甲硫氨酸组合的相对应制剂相比,pH 5.5的20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐缓冲液与10mM L-甲硫氨酸的组合显示最低的高分子量物质(HMWS)形成(图20A)和电荷变体的变化(图20B)。显示20mM的L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐一水合物浓度足以在药物产品的制造期间以及原料药和药物产品的储存期间维持制剂pH。

[0580] 基于240mM D-蔗糖与130mM氯化钠之间的比较,选择240mM D-蔗糖。亚可见颗粒计数在制剂之间相当。对于含有D-蔗糖的制剂,在25℃储存26周之后未观察到可见颗粒形成,而对于含有NaCl的制剂,观察到可见颗粒(图21)。

[0581] 表面活性剂的选择

[0582] 基于稳定性研究的结果,选择浓度为0.5mg/ml的PS20用于I期制剂,并保留直至商业制剂。设置使用在具有10mM L-甲硫氨酸和240mM D-蔗糖的20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐(pH 5.5)中的50mg/ml格菲妥单抗的研究,以研究泊洛沙姆188(P188)与PS20相比的稳

定效应。测试的P188水平为0.5mg/ml、0.7mg/ml和1.0mg/ml;PS20水平为0.1mg/ml、0.3mg/ml和0.5mg/ml。

[0583] 在初始时间点(T0)和在25℃振摇7天之后,通过SE-HPLC和IE-HPLC评定格菲妥单抗的纯度以及可见/亚可见颗粒形成,来评估所添加的表面活性剂的影响。

[0584] 对于所有P188浓度,均观察到可见颗粒形成。因此,将其从用于格菲妥单抗的适当表面活性剂中排除(图22)。在25℃振摇7天之后,在含有PS20的制剂中未检测到可见颗粒(图22)。在25℃振摇7天之后,对于含有0.1mg/ml PS20的制剂,观察到HMWS和电荷变体显著增加,而对于含有0.3mg/ml PS20的制剂,与含有0.5mg/ml PS20的制剂相比,观察到HMWS和电荷变体水平略有增加(图22)。在不同PS20浓度下,亚可见颗粒计数相当。在25℃振摇7天之后,对于含有0.1mg/mL PS20的制剂,观察到HMWS和电荷变体显著增加,而对于含有0.3mg/mL PS20的制剂,与含有0.5mg/mL PS20的制剂相比,观察到HMWS和电荷变体水平略有增加(图22)。因此,选择含有0.5mg/ml PS20的制剂。显示0.5mg/ml的聚山梨醇酯20水平足以保护格菲妥单抗免受加工(例如,搅拌、冷冻和解冻或剪切应力)、处理、储存和运输期间可能发生的应力的影响。在随后的多变量制剂稳健性研究中进一步评定0.2mg/ml至0.8mg/ml PS20的浓度范围(参见实例9,制剂稳健性研究)。该研究确认在此浓度范围内具有可接受的稳定性行为。

[0585] 实例9:格菲妥单抗的制剂稳健性研究

[0586] 原料药和药物产品的组成可基于制造因素(诸如缓冲液组分的称重公差)在一定范围内变化。进行多变量制剂稳健性研究,并且该研究表明,格菲妥单抗的相关质量属性(QA)在这些组分范围的边缘为可接受的。对三种因素进行两种水平的多变量稳定性研究,这些因素已被鉴定为在药物产品储存期间对关键质量属性(CQA)具有潜在影响。对以下三个制剂参数进行评定:

[0587] 1.蛋白质浓度

[0588] 2.pH

[0589] 3.PS20浓度

[0590] 此外,在单变量稳定性研究中分别评定三个制剂参数:

[0591] 4.缓冲液强度

[0592] 5.L-甲硫氨酸浓度

[0593] 6.D-蔗糖浓度

[0594] 多变量制剂稳健性研究表明,格菲妥单抗的相关CQA在整个所要求保护的制剂组合物范围内均为可接受的。

[0595] 研究设计

[0596] 进行风险评定以鉴定原料药和药物产品中的制剂参数,这些参数对于在保质期内维持产品质量很重要。相应地设置多变量研究和单变量研究。

[0597] 多变量研究(F6至F12)

[0598] 使用三个已鉴定的制剂参数(蛋白质浓度、pH和PS20浓度)作为输入因子,在两种水平上进行分次因子设计(分辨率III)稳定性研究。

[0599] 单变量研究(F13至F20)

[0600] 测试L-甲硫氨酸和D-蔗糖浓度(低水平和高水平)以及缓冲液强度(低水平和高水

平)。

[0601] 通过与高pH、高蛋白质浓度和高PS20浓度下的相对应制剂进行直接比较,对一种具有低蛋白质浓度、低pH和低PS20浓度的制剂进行评定。

[0602] 包括一种PS20浓度为0.3mg/ml的制剂以支持验收标准设置。

[0603] 将测试的制剂参数范围定义为覆盖药物产品规格验收标准和/或制造可接受范围,如表18中所述。表19显示包含包括3个中心点的15个实验的设计计划,其中3个中心点对应于目标商业制剂组合物。

[0604] 表18:制剂稳健性研究:目标制剂以及多变量和单变量研究范围

[0605]

		目标	低水平	高水平
格菲妥单抗浓度(mg/ml)	Mab	1	0.9	1.1
L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐(mM)	His	20	15	25
pH	pH	5.5	5.0	6.0
PS20浓度(mg/ml)	PS20	0.5	0.2(0.3)	0.8
D-蔗糖浓度(mM)	Suc	240	200	280
L-甲硫氨酸浓度(mM)	Met	10	5	15

[0606] 表19:制剂稳健性研究设计计划:评估的格菲妥单抗制剂

[0607]

多变量研究				在单变量研究中进行测试		
制剂	蛋白质浓度 (mg/ml)	pH	PS20 浓度 (mg/ml)	缓冲液强度 (mM)	D-蔗糖浓度 (mM)	L-甲硫氨酸浓度 (mM)
F6	0.90	5.0	0.80			
F7	1.10	5.0	0.20			
F8	0.90	6.0	0.20			
F9	1.10	6.0	0.80	20	240	10
F10 (目标)	1.00	5.5	0.50			
F11 (目标)	1.00	5.5	0.50			
F12 (目标)	1.00	5.5	0.50			
单变量研究						
F13	0.90	5.0	0.20	20	240	10
F14	1.00	5.5	0.50	20	200	10
F15	1.00	5.5	0.50	20	280	10
F16	1.00	5.5	0.50	20	240	5
F17	1.00	5.5	0.50	20	240	15
F18	1.00	5.5	0.50	15	240	10
F19	1.00	5.5	0.50	25	240	10
F20	1.00	5.5	0.30	20	240	10

[0608] 表19中所述的制剂组合物中格菲妥单抗的稳定性评估如下:

[0609] ●稳定性研究:

[0610] ○储存条件:实时(2℃至8℃)和加速(25℃)

[0611] ○测试频率:在上述储存条件下储存0周、4周、13周、26周(25℃储存结束)、39周、52周、78周和104周

[0612] ●应力测试：

[0613] ○5个冻融循环，

[0614] ○在2℃至8℃振摇一周，在25℃振摇一周

[0615] ●支持DS的稳定性：在-40℃储存0周、26周、52周和104周

[0616] 评定的QA：

[0617] ○通过SE-HPLC确定的HMWS和主峰

[0618] ○通过非还原CE-SDS确定的LMWS和主峰，

[0619] ○通过IE-HPLC确定的酸性峰2和3、酸性区、碱性区和主峰

[0620] ○通过紫外可见光谱确定的蛋白质含量

[0621] ○通过HPLC-ELSD确定的聚山梨醇酯20含量

[0622] ○通过RP-HPLC确定的L-甲硫氨酸和L-组氨酸浓度

[0623] ○通过肽图分析(LC-MS)确定的氧化和异构化

[0624] ○通过生物测定确定的效力

[0625] ○可见颗粒

[0626] ○亚可见颗粒

[0627] ○颜色、澄清度/乳光

[0628] ○pH

[0629] ○渗透压

[0630] ○密度

[0631] 总体数据分析程序

[0632] 收集每种制剂随时间推移的所有质量属性数据。评估每种QA随时间的相对变化。

[0633] 多变量研究：

[0634] 对每种质量属性和每种制剂随时间的推移拟合简单的线性回归。因此，计算每种质量属性和每种制剂的降解率。如果未明确提及，则将降解率报告为每周降解。这些降解率作为实验设计(DoE)研究中的反应进行评估，并研究了三个参数(蛋白质浓度、pH和PS20浓度)对这些降解的影响。如果与目标制剂相比，质量属性未随时间的推移而显示出有意义的变化，则不进行回归分析和效应估计。对于随时间的推移而显示出有意义变化的质量属性，使用线性回归来估计三个因素对降解率的主效应。此外，示出主效应图，以图形方式说明这些效应。

[0635] 单变量研究：

[0636] 对于在单变量研究中测试的参数，将在2℃至8℃储存39周之后的结果与T0进行比较，以鉴定潜在的变化。如果鉴定出变化，则计算降解率并将其与目标制剂的降解进行比较，以便估计所研究的制剂参数在边缘处的影响。在一些情况下，将每周降解率乘以104倍，转化为在104周内观察到的降解率。使用JMP软件(SAS Institute,Cary,NC,版本10.0或更高版本)进行回归分析。

[0637] 推荐储存条件(2℃至8℃)下稳健性制剂的稳定性：

[0638] 表20提供了在2℃至8℃储存39周之后与目标制剂相比的相对变化的评估的概述。对于在pH 6下配制的所有制剂(F8、F9和F20)，观察到增加的酸性变体水平(通过IE-HPLC确定的酸性区和酸性峰2)。观察到的酸性变体的增加反映在受影响的制剂中IE-HPLC主峰的

相对应降低。在2℃至8℃储存39周之后,在所有其他制剂的所有其他CQA中均未观察到变化。总之,将pH鉴定为关键制剂参数。所有其他制剂参数(蛋白质含量、PS20、L-甲硫氨酸和D-蔗糖浓度以及缓冲液强度)在研究的范围内均未显示出对所测试的CQA的影响。

[0639] 加速储存条件(25℃)下稳健性制剂的稳定性:

[0640] 与2℃至8℃数据相比,对于在pH 6下配制的所有制剂(F8、F9和F20),均观察到由于脱酰胺引起的增加的酸性变体水平(通过IE-HPLC确定的酸性区和酸性峰2),其反映在受影响的制剂中IE-HPLC主峰的降低上。此外,对于在pH 5下配制的F1和F2,通过CE-SDS所确定的LMWS的增加观察到片段化水平增加。这种增加反映在CE-SDS主峰的降低上。在25℃储存26周之后,在所有其他制剂的任何其他CQA中均未观察到变化。

[0641] 总之,25℃数据确认pH为关键制剂参数。所有其他制剂参数均未显示出对CQA的影响。

[0642] 表20:在2℃至8℃储存39周之后相关CQA的相对变化

[0643]

	与目标制剂相比的相对变化	与目标制剂相比的描述
通过 SE-HPLC 确定的纯度		
HMW 的总和	无变化	
主峰	无变化	
通过 NR-CE-SDS 确定的纯度		
LMWS 的总和	无变化	
主峰	无变化	
通过 IE-HPLC 确定的纯度		
酸性峰 2	增加	在 pH 6 下的所有制剂（F8、F9 和 F20）均增加
酸性峰 3	无变化	
酸性区	增加	在 pH 6 下的所有制剂（F8、F9 和 F20）均增加
主峰	降低	在 pH 6 下的所有制剂（F8、F9 和 F20）均降低
蛋白质浓度	无变化	
聚山梨醇酯 20 浓度	无变化	
通过 RP-HPLC 确定的 L-甲硫氨酸和 L-组氨酸浓度[a]	NA	
色氨酸和甲硫氨酸氧化	无变化	
天冬氨酸异构化[b]	无变化	
通过生物测定确定的效力	无变化	
可见颗粒	无变化	
亚可见颗粒	无变化	
颜色、澄清度/乳光	无变化	
溶液 pH	无变化	
渗透压[a]	NA	

[0645] [a]在t＝0和104周之后研究结束时的测量结果。

[0646] [b]在t＝0和仅在2℃-8℃储存52周和104周之后的测量结果。

[0647] 推荐原料药储存条件(-40℃)下稳健性制剂的稳定性：

[0648] 为支持原料药在整个所要求保护的制剂组合物范围内的稳定性,对储存在-40℃的药物产品稳健性制剂进行稳定性研究。研究结果确认,当制剂在推荐的原料药储存条件(-40℃)下储存26周时,未观察到所测试的质量属性发生显著变化。

[0649] 振摇和冻/融冻应力之后稳健性制剂的稳定性：

[0650] 制剂在2℃至8℃或25℃经历一周的振摇。此外,在-40℃与5℃之间进行五个冻/融循环之后,对制剂进行评估。所有样品在振摇或冻/融应力下几乎不含可见颗粒。

[0651] 对于所有制剂,在振摇或冻/融应力后,亚可见颗粒均无变化。与含有0.3mg/ml至0.8mg/ml PS20的所有其他制剂相比,具有低PS20水平的制剂(0.2mg/ml,F7、F8和F13)在振摇和冻/融应力之后未显示出任何产品质量影响。

[0652] 此结果确认,≥0.2mg/ml的聚山梨醇酯20水平足以保护蛋白质免受振摇和冻/融应力的影响。可比较地,与含有240mM至280mM D-蔗糖的所有其他制剂相比,具有低D-蔗糖水平(200mM,F19)的制剂在振摇和冻/融应力之后未显示出任何产品质量影响。此结果确认,≥200mM的D-蔗糖水平足以保护蛋白质免受冻/融应力的影响。当与对照样品相比时,在振摇或冻/融应力下,未观察到任何其他质量属性有实质变化。

[0653] 基于推荐储存条件(2℃至8℃)下的数据的已鉴定CQA的线性回归分析

[0654] 对受影响的CQA(溶液pH、蛋白质浓度和PS20浓度)进行简单线性回归分析。将pH鉴定为具有主要影响。将计算出的每周降解率通过乘以104周(＝24个月)以外推至为保质期结束(EoS)。外推的结果汇总于表21中。

[0655] 线性回归分析表明,所测试的pH范围对鉴定的CQA无显著影响,因为所有CQA均在稳定性验收标准内。然而,为了控制酸性区的增加,将药物产品放行时的pH验收标准收紧至5.2-5.8。

[0656] 表21:基于2℃至8℃数据的线性回归分析结果

[0657]

CQA	pH 5[a] 外推的 104 周之后的降解率	pH 5[a] EoS 时的计算值[b]	pH 6[a] 外推的 104 周之后的降解率	pH 6[a] EoS 时的计算值[b]	目标 (pH 5.5) 外推的 104 周之后的降解率	目标 (pH 5.5) EoS 时的计算值[b]
酸性峰 2（面积 %）	0.298	5.9	1.829	7.4	1.064	6.7
酸性峰 3（面积 %）	0.147	2.8	0.481	3.1	0.314	2.9
酸性区（面积 %）	1.509	15.7	3.996	18.2	2.753	16.9
LMWS（面积 %）	0.574	2.4	0.134	2.0	0.354	2.2

[0658] [a]所有其他参数均设置为线性回归分析的目标。

[0659] [b]通过104周之后的t＝0+降解率计算(使用所有制剂的平均t＝0)。

[0660] 结论

[0661] 外推数据表明6.0的高pH影响24个月(所要求保护的药物产品保质期)之后对酸性变体的水平。因此,将药物产品放行时的pH验收标准收紧至5.2至5.8,以限制药物产品稳定性期间酸性形式的形成。

[0662] 该制剂在保质期结束之前被视为保持稳健,因为:

[0663] ●对于在制剂范围边缘的所有制剂,CQA在t＝0时以及在2℃至8℃储存9个月之后符合放行验收标准

[0664] ●对于在制剂范围边缘的所有制剂,当使用降解率外推至EoS时,

[0665] CQA符合稳定性验收标准。

[0666] 实例10:格菲妥单抗制剂的聚山梨醇酯20降解的评定

[0667] 聚山梨醇酯20可经由氧化或水解机制而降解。聚山梨醇酯20的水解降解导致游离脂肪酸(FFA)诸如月桂酸的形成。在某些高浓度下,FFA可能形成亚可见颗粒或可见颗粒。再者,如果聚山梨醇酯20降解导致制剂中的聚山梨醇酯少于保护蛋白质免受搅拌应力的影响所需的量,则聚山梨醇酯20降解也令人担忧。

[0668] 由于这些担忧,在制剂开发期间对聚山梨醇酯20降解进行监测。在制剂开发期间观察到格菲妥单抗制剂中的PS20降解依赖于蛋白质浓度。对于25mg/ml制剂(图23),观察到显著的PS20降解,其在2℃至8℃观察到可见颗粒。对于5mg/ml制剂,PS20降解不太明显,在20个月之后观察到可见颗粒。亚可见颗粒计数不受影响。将可见颗粒分离并通过傅里叶变换红外(FTIR)分析进行表征,并且发现它们为FFA。在整个24个月研究时间内,1mg/ml制剂未显示出PS20降解(超出方法精度范围)并且无可见颗粒形成。亚可见颗粒计数始终较低。衍生自4个不同原料药(DS)批次的9个药物产品(DP)批次的长期稳定性数据确认不存在可见颗粒。图24提供示例性DP批次的长期稳定性数据的可视化。

[0669] 实例11:针对格菲妥单抗的物理化学使用稳定性研究

[0670] 格菲妥单抗药物产品作为用于IV输注的溶液的无菌液体浓缩物提供。该药物产品由含1mg/ml格菲妥单抗的20mM L-组氨酸/L-组氨酸盐酸盐缓冲液、240mM蔗糖、10mM L-甲硫氨酸、0.5mg/ml聚山梨醇酯20(pH 5.5)构成。格菲妥单抗是不含防腐剂的药物产品,以单剂量2.5ml和10ml玻璃小瓶供应。格菲妥单抗旨在用于在0.9%或0.45%氯化钠中稀释之后经由IV袋输注进行IV施用。基于递升给药方案的拟定注册剂量和方案为2.5/10/30mg。该剂量通过两种剂量溶液浓度(0.1mg/ml和0.6mg/ml)在IV袋中启用。在概括法中,测试了两种剂量溶液的兼容性以覆盖整个剂量范围(表22)。

[0671] 进行稳定性和兼容性研究以确认供输注的溶液在推荐的使用中条件下的物理化学稳定性。研究表明,供输注的格菲妥单抗溶液在典型的制备和施用程序期间保持稳定,并可以在2℃-8℃保持72小时,并且在环境室内光照条件下在30℃额外保持24小时,然后在≤25℃以不超过16小时进行输注。表明供输注的溶液在其中保持稳定的标称蛋白质浓度范围为0.1-0.6mg/ml。

[0672] 研究材料和设置:

[0673] 在稀释到含有0.9%氯化钠溶液和0.45%氯化钠溶液的100ml IV袋中之后来评估格菲妥单抗的物理化学稳定性,模拟商业设定中使用的处理程序。对于每种稀释剂,在大约0.1mg/ml(低剂量)和0.6mg/ml(高剂量)的稀释浓度下评估格菲妥单抗的产品质量,该剂量包括如表22中所概述的产品的预期浓度范围,

[0674] 对于0.9%氯化钠,测试两种不同的袋类型,这两种袋的药物产品接触表面由聚氯乙烯(PVC)或聚烯烃-聚乙烯-聚丙烯(PO-PE-PP)制成。对于0.45%氯化钠,测试袋的药物产品接触表面由PVC制成的袋子进行测试。对于每种稀释剂,以矩阵法设置三个药物产品批次用于稳定性评定。药物产品批次已在2℃-8℃储存20个月或7个月。

[0675] 表22:模拟使用中研究设置(PVC或PO-PE-PP IV袋中的0.9%氯化钠溶液和PVC IV袋中的0.45%氯化钠溶液)

[0676]

	剂量	稀释之后袋中的标称蛋白质浓度	从袋中取出的0.9% NaCl/0.45% NaCl	注入袋中的药物产品	保持时间	输注体积	输注速度
低剂量	2.5 mg	0.1 mg/ml	10ml	10ml	2℃–8℃: 72 h 30℃: 24 h	100ml	0.3 mg/h 3 ml/h
高剂量	30 mg	0.6 mg/ml	60ml	60ml	2℃–8℃: 72 h 30℃: 24 h	100ml	0.72 mg/h 1.2 ml/h

[0677] 通过使稀释的格菲妥单抗溶液穿过以下装置来模拟给药溶液的输注:1.含有PVC、聚乙烯(PE)、聚丁二烯(PBD)、聚氨酯(PUR)、硅酮和丙

[0678] 烯腈丁二烯苯乙烯(ABS)产品接触表面的输注装置,具有/不具有由聚砜或聚醚砜(PES)制成的0.2μm在线过滤器。

[0679] 2.由聚碳酸酯(PC)制成的三路活栓输注辅助器。

[0680] 3.由聚醚聚氨酯(PEU)或聚四氟乙烯(PTFE)制成的导管

[0681] 模拟输注在16小时的时段内进行,该时段长于预期的4-8小时输注持续时间,以确

保给药溶液在与输液器和辅助器的构造材料长时间接触期间的兼容性。

[0682] 在稀释之后和累积保持时间之后以及模拟输注结束时,从每个IV袋中收集样品用于分析。

[0683] 使用适当的稳定性指示方法测试样品,该方法包括通过SE-HPLC、IE-HPLC和CE-SDS确定纯度、通过UV确定蛋白质含量、通过光遮蔽确定亚可见颗粒、颜色、澄清度/乳光、pH和通过生物测定确定效力。通过CE-SDS确定LMW仅针对高剂量(0.6mg/ml)进行测量,因为在≤0.1mg/ml的样品浓度下,信号强度过低而无法对数据进行有意义的解释。然而,所呈现的效力数据确保了产品质量。

[0684] 结果:

[0685] 使用中研究表明,格菲妥单抗在稀释到0.9%或0.45%氯化钠溶液中并在2℃-8℃保持72小时并在环境室内光照条件下在30℃额外保持24小时,然后在≤25℃以不超过16小时进行输注时保持物理化学稳定。

[0686] 在这些兼容性研究中使用的药物产品批次先前已于推荐的储存温度(2℃-8℃)储存7-20个月,表明药物产品老化不影响使用中处理和施用期间的稳定性。

[0687] 实例12:格菲妥单抗制剂的微生物稳定性

[0688] 药物产品在施用之前必须使用无菌技术进行稀释。通过将药物产品稀释到含有0.9%氯化钠或0.45%氯化钠的输注袋中来制备用于IV施用的格菲妥单抗溶液。制备的输注溶液应立即使用。该药物产品不含有任何抗菌防腐剂;因此,在使用中处理期间必须通过保持适当的无菌条件来确保溶液的无菌性。

[0689] 进行微生物挑战研究以评估溶液在万一发生意外污染的情况下支持微生物增殖的倾向。评定七种不同的测试微生物(列于USP<51>中)在2℃至8℃长达96小时和在20℃至25℃长达48小时的增殖。当测量出高于初始值的差异不超过0.5$\log_{10}$单位时,结果符合“无增长”的验收标准。

[0690] 实例13.西沃司他单抗制剂

[0691] i.概述

[0692] 在临床开发期间,使用了额外的西沃司他单抗制剂和小瓶构造,如表23和24中所阐述。表23中提供了每种西沃司他单抗小瓶构造的制剂组分的标称含量。

[0693] 表23.西沃司他单抗药物产品制剂开发的概述

[0694]

浓度	20 mg/ml	3 mg/ml
说明	40 mg/小瓶	90 mg/小瓶
西沃司他单抗 (mg)	40	90.0
L-组氨酸 (mg)	6.21	93.0
冰乙酸 (mg)	1.56	24.0
蔗糖 (mg)	164	2466
聚山梨醇酯 20 (mg)	0.40	9.00
L-甲硫氨酸 (mg)	1.49	44.7
N-乙酰-DL-色氨酸 (mg)	0.148	2.22
注射用水 (ml)	QS 至 2.00	QS 至 30.0
主要包装构造	6 ml 小瓶	50 ml 小瓶

[0695] 表24.西沃司他单抗药物产品构造的概述

[0696]

组分	20 mg/ml 毒理学	20 mg/ml 临床	3 mg/ml 临床	3 mg/ml 临床
小瓶	6 ml I 型玻璃	6 ml I 型玻璃	2 ml I 型玻璃	50 ml I 型玻璃
塞子	20 mm 丁基橡胶氟树脂层压，血清型，USP/Ph.Eur.	20 mm 丁基橡胶氟树脂层压，血清型，USP/Ph.Eur.	13 mm 丁基橡胶氟树脂层压，血清型，USP/Ph.Eur.	20 mm 丁基橡胶氟树脂层压，血清型，USP/Ph.Eur.
覆盖层	20 mm 铝制密封件，带塑料翻盖	20 mm 铝制密封件，带塑料翻盖	13 mm 铝制密封件，带塑料翻盖	20 mm 铝制密封件，带塑料翻盖
灌装体积	2ml	2ml	0.4ml	20ml

[0697] ii.药物产品的组分

[0698] 原料药

[0699] 西沃司他单抗为药物产品中的唯一活性成分。原料药制造工艺、测试程序和发布标准(用于控制原料药)在相对应原料药部分中给出。在药物产品制造期间,经由稀释步骤改变原料药中的药物产品西沃司他单抗、聚山梨醇酯20和甲硫氨酸的浓度。如原料药和药物产品稳定性数据所证明,制剂中的赋形剂与活性药物之间不存在不兼容性。

[0700] 赋形剂

[0701] 3mg/ml和20mg/ml药物产品使用相同的缓冲液和赋形剂配制,目标pH为5.8。如下所述,与20mg/ml药物产品相比,3mg/ml药物产品用更大量的聚山梨醇酯20和甲硫氨酸配制。所有制剂赋形剂的基本原理如下所列,并且对于3mg/ml和20mg/ml制剂均相同。

[0702] L-组氨酸/冰乙酸[5.8]

[0703] 功能:将溶液pH维持在5.8的缓冲液。

[0704] 浓度:在原料药和药物产品中为20mM。

[0705] L-组氨酸在目标pH 5.8下提供缓冲能力。显示20mM的L-组氨酸浓度足以在药物产品的制造过程中以及原料药和药物产品的储存期间维持制剂pH。

[0706] 缓冲系统(组氨酸乙酸盐)的总浓度为20mM。

[0707] 蔗糖功能:张度剂。

[0708] 浓度:在原料药和药物产品中为240mM。

[0709] 240mM的蔗糖浓度足以实现等渗性并且为原料药和药物产品提供稳定性。

[0710] 聚山梨酯20

[0711] 功能:表面活性剂,用于防止由表面吸附导致的损失,以及使可溶性聚集体和/或不溶性蛋白质颗粒的潜在形成最小化。

[0712] 浓度:在原料药中为0.2mg/ml且在药物产品中为1.2mg/ml。

[0713] 已显示原料药中0.2mg/ml和药物产品中1.2mg/ml的聚山梨醇酯20水平足以保护西沃司他单抗免受加工(例如冷冻和解冻)、处理以及储存和在用施用期间可能出现的应力。

[0714] L-甲硫氨酸

[0715] 功能:稳定剂。

[0716] 浓度:在原料药中为5mM L-甲硫氨酸且在药物产品中为10mM L-甲硫氨酸。

[0717] 5mM的L-甲硫氨酸原料药浓度和10mM的药物产品浓度足以为西沃司他单抗原料药和药物产品提供稳定性。

[0718] N-乙酰-DL-色氨酸

[0719] 功能:抗氧化剂。

[0720] 浓度:在原料药和药物产品中为0.3mM N-乙酰-DL-色氨酸。

[0721] 浓度为0.3mM的N-乙酰-DL-色氨酸足以为西沃司他单抗原料药和药物产品提供稳定性。

[0722] iii.药物产品

[0723] 制剂开发

[0724] 开发了一种设计为静脉内(IV)输注或皮下(SC)注射溶液的单一剂量制剂,用于起始1期西沃司他单抗临床试验。原料药和药物产品分别由含50mg/ml和20mg/ml西沃司他单抗的20mM L-组氨酸乙酸盐、240mM蔗糖、5mM L-甲硫氨酸、0.3mM N-乙酰-DL-色氨酸、0.2mg/ml聚山梨醇酯20(pH 5.8)构成。由于药物产品制造期间的稀释步骤,药物产品中的蛋白质浓度与原料药中的蛋白质浓度不同。

[0725] 开发出3mg/ml药物产品制剂,以使得能够以IV输注的形式递送后续临床试验中预期的更广泛剂量范围。该药物产品制剂由含3mg/ml西沃司他单抗的20mM L-组氨酸乙酸盐、240mM蔗糖、10mM L-甲硫氨酸、0.3mM N-乙酰-DL-色氨酸和1.2mg/ml聚山梨醇酯20(pH 5.8)构成。由于稀释步骤,制剂与原料药不同,该稀释步骤改变蛋白质、L-甲硫氨酸和聚山梨醇酯20在稀释为药物产品期间的浓度。在3mg/ml药物产品的开发期间,原料药组成不改变。

[0726] 除了聚山梨醇酯20和L-甲硫氨酸外,20mg/ml和3mg/ml制剂的所有赋形剂和赋形剂浓度均相同。基于被设计以确定稀释药物产品在含盐水IV袋中的稳定性的研究来确定表面活性剂浓度。根据此研究的结果,发现1.2mg/ml聚山梨醇酯20足以确保药物产品稳定性,并因此选择用于3mg/ml药物产品制剂。L-甲硫氨酸作为稳定剂添加至药物产品制剂中。制剂开发研究表明,10mM L-甲硫氨酸足以确保3mg/ml药物产品制剂的稳定性。进行制剂研究

以证明3mg/ml西沃司他单抗药物产品具有可接受的稳定性。

[0727] 基于来自这些制剂开发研究的结果,选择由以下项组成的液体制剂作为药物产品制剂:含3mg/ml西沃司他单抗的20mM组氨酸乙酸盐、240mM蔗糖、10mM L-甲硫氨酸、0.3mM N-乙酰-DL-色氨酸、1.2mg/ml聚山梨醇酯20,目标pH为5.8。

[0728] 为起始临床研究,使用西沃司他单抗40mg/小瓶(20mg/ml)。当前患者过渡到使用且新患者开始使用新开发的1.2mg/小瓶和60mg/小瓶药物产品。

[0729] 物理化学和生物学特性

[0730] 所有表征测试均在原料药上进行。药物产品批次的扩展表征在下表25中提供。

[0731] 表25.西沃司他单抗药物产品批次的扩展表征

[0732]

分析程序	第 1 批	第 2 批
基于质谱的抗 CD3 同二聚体 (%)	< 0.5	< 0.5
T 细胞活化测定 (%)	< 0.5	< 0.5

[0733] 当避光时,制剂在推荐的2℃-8℃储存条件下保持稳定。

[0734] 如3mg/ml药品代表性稳定性研究所示,在推荐储存温度(2℃至8℃)下,可见或亚可见颗粒(≥10μm和≥25μm)未增加。

[0735] 尺寸为≥2μm和≥5μm(外加≥10μm和≥25μm,其为控制系统的一部分)的亚可见颗粒通过开发使用遮光法进行监测。这些评估作为在药物产品发布时和稳定性期间进行的扩展表征的一部分进行。

[0736] 静脉内(IV)

[0737] 作为预防措施,在此开发阶段使用在线过滤器(0.2μm)施用临床材料。

[0738] iv.制造工艺开发

[0739] 表26突出显示了药物产品制造工艺中的变化。原料药的制造工艺无改变。西沃司他单抗的药物产品制造工艺为标准的无菌制造程序。对于40mg/小瓶药物产品(DP),将解冻的原料药用制剂缓冲液稀释至20mg/ml,然后通过生物负载减少和无菌过滤步骤进行处理。接下来,将2ml稀释溶液灌装到6ml玻璃小瓶中、盖上塞子、盖上盖子、贴上标签且包装。对于1.2mg/小瓶和60mg/小瓶DP,将解冻的原料药用稀释缓冲液稀释至3mg/ml,然后通过生物负载减少和无菌过滤步骤进行处理。接下来,将0.4ml稀释溶液灌装到2ml玻璃小瓶中或将20ml稀释溶液灌装到50ml小瓶中。然后将小瓶盖上塞子、盖上盖子、贴上标签且包装。

[0740] 表26.西沃司他单抗20mg/ml DP和3mg/ml DP的制造工艺比较

[0741]

工艺步骤	小瓶注射用西沃司他单抗溶液	小瓶注射用西沃司他单抗溶液
1	解冻原料药溶液	解冻原料药溶液
2	制备缓冲溶液	制备缓冲溶液
3	将原料药溶液与缓冲溶液混合，以得到浓度为 20 mg/ml 西沃司他单抗的原料药物产品溶液	将原料药溶液与缓冲液混合，以得到浓度为 3 mg/ml 西沃司他单抗的原料药物产品溶液
4	生物负载减少过滤和无菌过滤（在线过滤）	生物负载减少过滤和无菌过滤（在线过滤）
5	无菌灌装到 6 ml 小瓶中	无菌灌装到 2 ml 或 50 ml 小瓶中
6	用塞子封闭小瓶	用塞子封闭小瓶
7	盖上铝制密封盖	盖上铝制密封盖

[0742] 实例14:莫苏尼妥珠单抗的使用中制剂

[0743] 莫苏尼妥珠单抗药物产品作为IV供输注的溶液的无菌液体浓缩物提供。该药物产品由含1mg/ml莫苏尼妥珠单抗的10mM组氨酸乙酸盐缓冲液、240mM蔗糖、10mM甲硫氨酸、0.6％(w/v)聚山梨醇酯20(pH 5.8)构成。莫苏尼妥珠单抗是不含防腐剂的药物产品,以单剂量2ml和50ml玻璃小瓶供应。莫苏尼妥珠单抗旨在用于在0.9％或0.45％氯化钠(生理盐水溶液)中稀释之后经由IV袋输注进行IV施用。拟定的分步负荷给药方案为1/2/60/60/30mg。例如,使用1mg/ml莫苏尼妥珠单抗的药物产品,可使用以下稀释度来递送指示的剂量(表27):

[0744] 表27.莫苏尼妥珠单抗制剂(1mg/ml药物产品)的稀释

[0745]

莫苏尼妥珠单抗的剂量	0.9% 或 0.45% 氯化钠溶液中莫苏尼妥珠单抗的体积	输注尺寸	莫苏尼妥珠单抗的最终浓度
1 mg	1ml	50 ml 或 100 ml	0.02 mg/ml 或 0.01 mg/ml
2 mg	2ml	50 ml 或 100 ml	0.04 mg/ml 或 0.02 mg/ml

[0746]

30 mg	30ml	100 ml 或 250 ml	0.3 mg/ml 或 0.12 mg/ml
60 mg	60ml	250ml	0.24 mg/ml

[0747] 实施方案

[0748] 可以根据以下编号的实施例中的任一个来定义本文描述的技术的一些实施例:

[0749] 1.一种药物组合物,其包含治疗性蛋白质、聚山梨醇酯20(PS20)、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中该PS20与该治疗性蛋白质的摩尔比为100或更低,该PS20的浓度为0.01％至0.12％重量/体积(weight-by-volume,w/v),该甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且该缓冲剂的浓度为5mM至20mM。

[0750] 2.根据实施例1所述的药物组合物,其中该治疗性蛋白质的浓度为约10mg/ml或更低。

[0751] 3.根据实施例1或2所述的药物组合物,其中该治疗性蛋白质的浓度在约0.1mg/ml至约10mg/ml之间。

[0752] 4.根据实施例3所述的药物组合物,其中该治疗性的浓度为约3mg/ml或约1mg/ml。

[0753] 5.根据实施例1至4中任一项所述的药物组合物,其中该PS20与该治疗性蛋白质的该摩尔比为45至100。

[0754] 6.根据实施例5所述的药物组合物,其中该PS20与该治疗性蛋白质的该摩尔比为约48、约71或约79。

[0755] 7.根据实施例1至6中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物被配制为药物产品(DP)。

[0756] 8.根据实施例1至7中任一项所述的药物组合物,其中该甲硫氨酸的浓度为约2.5mM至约20mM。

[0757] 9.根据实施例7所述的药物组合物,其中该甲硫氨酸的浓度为约10mM。

[0758] 10.根据实施例1至9中任一项所述的药物组合物,其中该缓冲剂的浓度为约5mM至约25mM。

[0759] 11.根据实施例10所述的药物组合物,其中该缓冲剂的浓度为约10mM或约20mM。

[0760] 12.根据实施例1至11中任一项所述的药物组合物,其中该缓冲剂为组氨酸、磷酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐或其组合。

[0761] 13.根据实施例12所述的药物组合物,其中该缓冲剂为组氨酸。

[0762] 14.根据实施例13所述的药物组合物,其中该组氨酸为组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl。

[0763] 15.根据实施例10至14中任一项所述的药物组合物,其中该缓冲剂为浓度为约10mM或约20mM的组氨酸乙酸盐。

[0764] 16.根据实施例10至14中任一项所述的药物组合物,其中该缓冲剂为浓度为约20mM的组氨酸HCl。

[0765] 17.根据实施例1至16中任一项所述的药物组合物,其进一步包含张度剂。

[0766] 18.根据实施例17所述的药物组合物,其中该张度剂为糖、氨基酸或盐。

[0767] 19.根据实施例18所述的药物组合物,其中该张度剂为糖。

[0768] 20.根据实施例19所述的药物组合物,其中该糖为蔗糖、葡萄糖、甘油或海藻糖。

[0769] 21.根据实施例20所述的药物组合物,其中该糖为蔗糖。

[0770] 22.根据实施例17至21中任一项所述的药物组合物,其中该张度剂的浓度为约100mM至约500mM。

[0771] 23.根据实施例22所述的药物组合物,其中该张度剂的浓度为约200mM至约300mM。

[0772] 24.根据实施例23所述的药物组合物,其中该张度剂的浓度为约240mM。

[0773] 25.根据实施例1至24中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物具有约4.5至约8的pH。

[0774] 26.根据实施例25所述的药物组合物,其中该药物组合物的pH为约5.1至约6.1。

[0775] 27.根据实施例26所述的药物组合物,其中该药物组合物的pH为约5.5或约5.8。

[0776] 28.根据实施例1至27中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物进一步包括抗氧化剂。

[0777] 29.根据实施例28所述的药物组合物,其中该抗氧化剂为N-乙酰基-DL-色氨酸。

[0778] 30.根据实施例29所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度在0.1mM与0.5mM之间。

[0779] 31.根据实施例30所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为约0.3mM。

[0780] 32.根据实施例1至31中任一项所述的药物组合物,其中该治疗性蛋白质为抗体。

[0781] 33.根据实施例32所述的药物组合物,其中该抗体为双特异性抗体。

[0782] 34.根据实施例33所述的药物组合物,其中该双特异性抗体包含至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域和至少一个与靶标抗原特异性结合的抗原结合结构域。

[0783] 35.根据实施例34所述的药物组合物,其中该双特异性抗体在Fc区的位置257(EU编号)处具有甲硫氨酸,并且其中在该Fc区的位置257处的甲硫氨酸的氧化在40℃历经两周而小于约10%。

[0784] 36.根据实施例35所述的药物组合物,其中在该Fc区的位置257处的甲硫氨酸的氧化在40℃历经两周而不大于约6%。

[0785] 37.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、表面活性剂、甲硫氨酸和载体,其中该药物组合物具有约5.5或5.8的pH,并且其中:

[0786] (i)该双特异性抗体包含至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域和至少一个与靶标抗原特异性结合的抗原结合结构域,并且其中该双特异性抗体的浓度为约10mg/ml或更低,

[0787] (ii)该表面活性剂的浓度为约0.05%至约0.12%w/v,以及

[0788] (iii)该甲硫氨酸的浓度为约10mM。

[0789] 38.根据实施例37所述的药物组合物,其中该表面活性剂与该双特异性抗体的摩尔比为100或更低。

[0790] 39.根据实施例37或38所述的药物组合物,其中该表面活性剂为PS20或泊洛沙姆188(P188)。

[0791] 40.根据实施例39所述的药物组合物,其中该表面活性剂为PS20并且该PS20的浓度为约0.05%、0.06%或约0.12%w/v。

[0792] 41.根据实施例40所述的药物组合物,其中该PS20与该双特异性抗体的摩尔比为约45至约100。

[0793] 42.根据实施例41所述的药物组合物,其中该PS20与该双特异性抗体的该摩尔比为约48、约71或约79。

[0794] 43.根据实施例39所述的药物组合物,其中该表面活性剂为P188并且该P188的浓度为约0.1%w/v。

[0795] 44.根据实施例43所述的药物组合物,其中该P188与该双特异性抗体的摩尔比为约5至约25。

[0796] 45.根据实施例44所述的药物组合物,其中该P188与该双特异性抗体的该摩尔比为约17。

[0797] 46.根据实施例37至45中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体的浓度在约0.1mg/ml至约5mg/ml之间。

[0798] 47.根据实施例46所述的药物组合物,其中该双特异性抗体的浓度为约1mg/ml或约3mg/ml。

[0799] 48.根据实施例37至47中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物被配制为

DP。

[0800] 49.根据实施例37至48中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物进一步包含浓度为约10mM或约20mM的组氨酸。

[0801] 50.根据实施例49所述的药物组合物,其中该组氨酸为组氨酸乙酸盐或组氨酸HCl。

[0802] 51.根据实施例37至50中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物进一步包含浓度为约240mM的蔗糖。

[0803] 52.根据实施例37至51中任一项所述的药物组合物,其中该载体为水。

[0804] 53.根据实施例32至52中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物进一步包括抗氧化剂。

[0805] 54.根据实施例53所述的药物组合物,其中该抗氧化剂为N-乙酰基-DL-色氨酸。

[0806] 55.根据实施例54所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度在0.1mM与0.5mM之间。

[0807] 56.根据实施例55所述的药物组合物,其中N-乙酰基-DL-色氨酸的浓度为约0.3mM。

[0808] 57.根据实施例32至56中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体包含抗CD3臂和抗靶标臂。

[0809] 58.根据实施例57所述的药物组合物,其中该抗靶标臂为抗CD20臂。

[0810] 59.根据实施例58所述的药物组合物,其中该抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:

[0811] (i)高变区(HVR)-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

[0812] (ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0813] (iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

[0814] (iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

[0815] (v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;以及

[0816] (vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0817] 60.根据实施例59所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域包含:(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0818] 61.根据实施例60所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列且该CD3结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0819] 62.根据实施例58至61中任一项所述的药物组合物,其中该抗CD20臂包含CD20结合结构域,该CD20结合结构域包含:

[0820] (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;

[0821] (ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;

[0822] (iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0823] (iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;

[0824] (v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;以及

[0825] (vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0826] 63.根据实施例62所述的药物组合物,其中该CD20结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0827] 64.根据实施例63所述的药物组合物,其中该CD20结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列且该CD20结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0828] 65.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、PS20、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中该PS20与该双特异性抗体的摩尔比为约100或更低,该PS20的浓度为约0.01%至约0.12%w/v,该甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且该缓冲剂的浓度为5mM至20mM,其中该双特异性抗体包含抗CD3臂和抗CD20臂,并且其中:

[0829] (a)该抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:

[0830] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

[0831] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0832] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

[0833] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

[0834] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;以及

[0835] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及

[0836] (b)该抗CD20臂包含CD20结合结构域,该CD20结合结构域包含:

[0837] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;

[0838] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;

[0839] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0840] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;

[0841] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;以及

[0842] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0843] 66.根据实施例65所述的药物组合物,其中

[0844] 该CD3结合结构域包含:

[0845] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;

[0846] 并且该CD20结合结构域包含:

[0847] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0848] 67.根据实施例66所述的药物组合物,其中:

[0849] (a)该CD3结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列且该CD3结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,以及

[0850] (b)该CD20结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列且该CD20结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0851] 68.根据实施例57所述的药物组合物,其中该抗靶标臂为抗FcRH5臂。

[0852] 69.根据实施例68所述的药物组合物,其中该抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:

[0853] (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;

[0854] (ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;

[0855] (iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;

[0856] (iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;

[0857] (v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;以及

[0858] (vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0859] 70.根据实施例69所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0860] 71.根据实施例70所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列且该CD3结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0861] 72.根据实施例68至71中任一项所述的药物组合物,其中该抗FcRH5臂包含FcRH5结合结构域,该FcRH5结合结构域包含:

[0862] (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;

[0863] (ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;

[0864] (iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列;

[0865] (iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;

[0866] (v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;以及

[0867] (vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0868] 73.根据实施例72所述的药物组合物,其中该FcRH5结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0869] 74.根据实施例73所述的药物组合物,其中该FcRH5结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列且该FcRH5结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0870] 75.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、PS20、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中该PS20与该双特异性抗体的摩尔比为约100或更低,该PS20的浓度为约0.01%至约0.12%w/v,该甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且该缓冲剂的浓度为5mM至20mM,其中该双特异性抗体包含抗CD3臂和抗FcRH5臂,并且其中:

[0871] (a)该抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:

[0872] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;

[0873] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;

[0874] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;

[0875] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;

[0876] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;以及

[0877] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列;以及

[0878] (b)该抗FcRH5臂包含FcRH5结合结构域,该FcRH5结合结构域包含:

[0879] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;

[0880] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;

[0881] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列;

[0882] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;

[0883] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;以及

[0884] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0885] 76.根据实施例75所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域包含:

[0886] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;

[0887] 并且该FcRH5结合结构域包含:

[0888] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0889] 77.根据实施例76所述的药物组合物,其中:

[0890] (a)该CD3结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列且该CD3结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列,以及

[0891] (b)该FcRH5结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列且该FcRH5结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0892] 78.根据实施例57所述的药物组合物,其中该抗靶标臂为抗HER2臂。

[0893] 79.根据实施例78所述的药物组合物,其中该抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:

[0894] (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;

[0895] (ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;

[0896] (iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;

[0897] (iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;

[0898] (v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;以及

[0899] (vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列。

[0900] 80.根据实施例79所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:116的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0901] 81.根据实施例80所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域的该VH结构域包含

SEQ ID NO:115的氨基酸序列且该CD3结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列。

[0902] 82.根据实施例78至81中任一项所述的药物组合物,其中该抗HER2臂包含HER2结合结构域,该HER2结合结构域包含:

[0903] (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

[0904] (ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

[0905] (iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;

[0906] (iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;

[0907] (v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;以及

[0908] (vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0909] 83.根据实施例82所述的药物组合物,其中该HER2结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0910] 84.根据实施例83所述的药物组合物,其中该HER2结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列且该HER2结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0911] 85.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、PS20、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中该PS20与该双特异性抗体的摩尔比为约100或更低,该PS20的浓度为约0.01%至约0.12%w/v,该甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且该缓冲剂的浓度为5mM至20mM,其中该双特异性抗体包含抗CD3臂和抗HER2臂,并且其中:

[0912] (a)该抗CD3臂包含CD3结合结构域,该CD3结合结构域包含:

[0913] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;

[0914] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;

[0915] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;

[0916] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;

[0917] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;以及

[0918] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;以及

[0919] (b)该抗HER2臂包含HER2结合结构域,该HER2结合结构域包含:

[0920] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

[0921] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

[0922] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;

[0923] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;

[0924] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;以及

[0925] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0926] 86.根据实施例85所述的药物组合物,其中该CD3结合结构域包含:

[0927] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:116的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;

[0928] 并且该HER2结合结构域包含:

[0929] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0930] 87.根据实施例86所述的药物组合物,其中:

[0931] (a)该CD3结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列且该CD3结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列,以及

[0932] (b)该HER2结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列且该HER2结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0933] 88.根据实施例32所述的药物组合物,其中该抗体为IgG抗体,或者根据实施例33、34和实施例57至87中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体为IgG抗体。

[0934] 89.根据实施例88所述的药物组合物,其中该IgG抗体为IgG_1抗体。

[0935] 90.根据实施例88或89所述的药物组合物,其中该双特异性抗体在该Fc区中包含一个或多个取代突变。

[0936] 91.根据实施例88至90中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体包含去糖基化位点突变。

[0937] 92.根据实施例91所述的药物组合物,其中该去糖基化位点突变为取代突变。

[0938] 93.根据实施例90所述的药物组合物,其中该一个或多个取代突变降低该双特异性抗体的效应子功能。

[0939] 94.根据实施例80所述的药物组合物,其中该一个或多个取代突变在选自由以下项组成的组的一个或多个氨基酸残基处:N297、L234、L235、D265和P329(EU编号)。

[0940] 95.根据实施例94所述的药物组合物,其中该取代突变为选自由以下项组成的组的至少一者:N297A、N297G、L234A、L235A、D265A和P329G(EU编号)。

[0941] 96.根据实施例80所述的药物组合物,其中该Fc区中的该一个或多个取代突变包含一个或多个杵臼突变。

[0942] 97.根据实施例88至86中任一项所述的药物组合物,其中该抗靶标臂包含T366W和N297G取代突变,并且该抗CD3臂包含T366S、L368A、Y407V和N297G取代突变。

[0943] 98.根据实施例58至67和实施例88至97中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体为莫苏尼妥珠单抗。

[0944] 99.根据实施例68至77和实施例88至97中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体为西沃司他单抗。

[0945] 100.根据实施例78至97中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体为芦莫妥单抗。

[0946] 101.根据实施例34至57中任一项所述的药物组合物,其中该靶标抗原为CD20。

[0947] 102.根据实施例101所述的药物组合物,其中该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域包含:

[0948] (a)重链可变区,其包含:

[0949] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;

[0950] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;以及

[0951] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;以及

[0952] (b)轻链可变区,其包含:

[0953] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;

[0954] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列;以及

[0955] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0956] 103.根据实施例102所述的药物组合物,其中该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0957] 104.根据实施例103所述的药物组合物,其中该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列且该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0958] 105.根据实施例102至104中任一项所述的药物组合物,其中该至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域包含:

[0959] (a)重链可变区,其包含:

[0960] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;

[0961] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;以及

[0962] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;以及

[0963] (b)轻链可变区,其包含:

[0964] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;

[0965] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;以及

[0966] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0967] 106.根据实施例105所述的药物组合物,其中该至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域包含:(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0968] 107.根据实施例106所述的药物组合物,其中该至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列且该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0969] 108.一种药物组合物,其包含双特异性抗体、PS20、甲硫氨酸、缓冲剂和载体,其中该PS20与该双特异性抗体的摩尔比为约100或更低,该PS20的浓度为约0.01%至约0.12%w/v,该甲硫氨酸的浓度为1mM至50mM,并且该缓冲剂的浓度为5mM至20mM,其中该双特异性抗体包含至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域和至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域,并且其中:

[0970] (a)该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域包含:

[0971] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;

[0972] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;

[0973] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;

[0974] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;

[0975] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列;以及

[0976] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列;以及

[0977] (b)该至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域包含:

[0978] HVR-H1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;

[0979] HVR-H2,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;

[0980] HVR-H3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;

[0981] HVR-L1,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;

[0982] HVR-L2,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;以及

[0983] HVR-L3,其包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0984] 109.根据实施例108所述的药物组合物,其中:

[0985] 该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域包含:

[0986] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域;

[0987] 并且该至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域包含:

[0988] (a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0989] 110.根据实施例109所述的药物组合物,其中:

[0990] (a)该至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列且至少一个与CD3特异性结合的抗原结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,以及

[0991] (b)该至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域的该VH结构域包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列且该至少一个与CD20特异性结合的抗原结合结构域的该VL结构域包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0992] 111.根据实施例101至110中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体对于CD20是双价的且对于CD3是单价的。

[0993] 112.根据实施例101至110中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体包含两个与CD20特异性结合的Fab分子和一个与CD3特异性结合的Fab分子。

[0994] 113.根据实施例112所述的药物组合物,其中与CD3特异性结合的Fab分子为交叉Fab分子,其中Fab轻链和Fab轻链重链的可变结构域VL和VH彼此替换。

[0995] 114.根据实施例112或113所述的药物组合物,其中在第二Fab和第三Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号),并且位置123处的氨基酸被赖氨酸(K)或精氨酸(R)、特别是被精氨酸(R)取代(根据Kabat编号),并且其中在第二Fab和第三Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号),并且位置213处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(EU编号)。

[0996] 115.根据实施例101至114中任一项所述的药物组合物,其中双特异性抗体包含由能够稳定缔合的第一亚基和第二亚基构成的Fc结构域。

[0997] 116.根据实施例34至115中任一项所述的药物组合物,其中该至少一个与CD3特异

性结合的抗原结合结构域与人CD3多肽或食蟹猴(cyno)CD3多肽结合。

[0998] 117.根据实施例116所述的药物组合物,其中该人CD3多肽或该食蟹猴CD3多肽分别为人CD3ε多肽或食蟹猴CD3ε多肽。

[0999] 118.根据实施例116所述的药物组合物,其中该人CD3多肽或该食蟹猴CD3多肽分别为人CD3γ多肽或食蟹猴CD3γ多肽。

[1000] 119.根据实施例33至118中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体为单克隆抗体。

[1001] 120.根据实施例33至119中任一项所述的药物组合物,其中该双特异性抗体为人的、人源化的、或嵌合的。

[1002] 121.根据实施例1至120中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物呈单位剂型。

[1003] 122.根据实施例121所述的药物组合物,其中该单位剂型为供稀释的液体制剂。

[1004] 123.根据实施例122所述的药物组合物,其中在具有约50ml的体积的容器中供应该供稀释的液体制剂。

[1005] 124.根据实施例122所述的药物组合物,其中在具有约15ml的体积的容器中供应该供稀释的液体制剂。

[1006] 125.根据实施例122所述的药物组合物,其中在具有约2ml的体积的容器中供应该供稀释的液体制剂。

[1007] 126.根据实施例122所述的药物组合物,其中在具有约1ml的体积的容器中供应该供稀释的液体制剂。

[1008] 127.根据实施例122或123所述的药物组合物,其中该供稀释的液体制剂的体积为约15ml或约30ml。

[1009] 128.根据实施例122或124所述的药物组合物,其中该供稀释的液体制剂的体积为约8ml或约15mL。

[1010] 129.根据实施例122或125所述的药物组合物,其中该供稀释的液体制剂的体积为约0.5ml或约0.9ml。

[1011] 130.根据实施例122或126所述的药物组合物,其中该供稀释的液体制剂的体积为约0.5ml或约0.9ml。

[1012] 131.根据实施例122至130中任一项所述的药物组合物,其中该液体制剂用于用包含0.45%或0.9%(w/v)NaCl的生理盐水溶液稀释。

[1013] 132.根据实施例1至131中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物包含如通过高准确度液体颗粒计数(HIAC)所检测的每ml不多于1,000个具有≥2μm的直径的颗粒。

[1014] 133.根据实施例1至132中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物当在5℃±3℃且避光储存时具有至少36个月的保质期。

[1015] 134.根据实施例1至133中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物通过一个或多个冻融循环为稳定的。

[1016] 135.根据实施例134所述的药物组合物,其中该药物组合物通过三个或更多个冻融循环为稳定的。

[1017] 136.根据实施例1至135中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物在约25℃

稳定达约两周或更久。

[1018] 137.根据实施例136所述的药物组合物,其中该药物组合物在约25℃稳定达约四周或更久。

[1019] 138.根据实施例1至137中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物在-20℃稳定达约48个月或更久。

[1020] 139.根据实施例134至138中任一项所述的药物组合物,其中通过尺寸排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)来评定稳定性。

[1021] 140.根据实施例139所述的药物组合物,其中如果该药物组合物维持如通过SE-HPLC所测量的变化小于5%的纯度,则确定该药物组合物为稳定的。

[1022] 141.根据实施例134至138中任一项所述的药物组合物,其中通过非还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)测定来评定稳定性。

[1023] 142.根据实施例141所述的药物组合物,其中如果该药物组合物维持如通过非还原CE-SDS测定所测量的变化小于5%的纯度,则确定该药物组合物为稳定的。

[1024] 143.根据实施例141或142所述的药物组合物,其中该非还原CE-SDS测定为微芯片CE-SDS(mCE-SDS)测定。

[1025] 144.根据实施例1至143中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的约85%或更高的纯度。

[1026] 145.根据实施例144所述的药物组合物,其中该药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的约90%或更高的纯度。

[1027] 146.根据实施例145所述的药物组合物,其中该药物组合物具有如通过SE-HPLC所评定的约95%或更高的纯度。

[1028] 147.根据实施例144至146中任一项所述的药物组合物,其中如通过SE-HPLC所评定的该药物组合物的该纯度在约5℃维持大致相同达约36个月或更久。

[1029] 148.根据实施例147所述的药物组合物,其中如通过SE-HPLC所评定的该药物组合物的该纯度在约5℃维持大致相同达约42个月或更久。

[1030] 149.根据实施例148所述的药物组合物,其中如通过SE-HPLC所评定的该药物组合物的该纯度在约5℃维持大致相同达约64个月或更久。

[1031] 150.根据实施例1至143中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约75%或更高的纯度。

[1032] 151.根据实施例150所述的药物组合物,其中该药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约80%或更高的纯度。

[1033] 152.根据实施例151所述的药物组合物,其中该药物组合物具有如通过非还原CE-SDS测定所评定的约85%或更高的纯度。

[1034] 153.根据实施例150至152中任一项所述的药物组合物,其中如通过非还原CE-SDS测定所评定的该药物组合物的该纯度在约5℃维持达约36个月或更久。

[1035] 154.根据实施例153所述的药物组合物,其中如通过非还原CE-SDS测定所评定的该药物组合物的该纯度在约5℃维持达约42个月或更久。

[1036] 155.根据实施例150至154中任一项所述的药物组合物,其中该非还原CE-SDS测定为微芯片CE-SDS(mCE-SDS)测定。

[1037] 156.根据实施例1至155中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物被配制用于静脉内施用。

[1038] 157.根据实施例1至156中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物不含有防腐剂。

[1039] 158.根据实施例1至157中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物被配制用于在用包含0.45%或0.9% NaCl的生理盐水溶液稀释之后通过输注施用。

[1040] 159.根据实施例1至157中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物被配制用于在不稀释的情况下通过输注施用。

[1041] 160.根据实施例1至159中任一项所述的药物组合物,其用为药物。

[1042] 161.一种根据实施例1至159中任一项所述的药物组合物在制造药物中的用途,该药物用于:

[1043] (i)治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展;或者

[1044] (ii)增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能。

[1045] 162.根据实施例1至159中任一项所述的药物组合物,其用于:

[1046] (i)治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展;或者

[1047] (ii)增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能。

[1048] 163.根据实施例161或162所述的用途或供使用的药物组合物,其中该细胞增殖性疾患为癌症。

[1049] 164.根据实施例160至163中任一项所述的用途或供使用的药物组合物,其中该治疗性蛋白质为被配制以与位于免疫效应细胞上的CD3分子和位于除了免疫效应细胞外的靶标细胞上的靶标分子结合的双特异性抗体。

[1050] 165.根据实施例164所述的用途或供使用的药物组合物,其中该双特异性抗体在与该CD3分子和与该靶标分子结合后活化该免疫效应细胞。

[1051] 166.根据实施例165所述的用途或供使用的药物组合物,其中活化的免疫效应细胞能够对该靶标细胞施加细胞毒性效应和/或细胞凋亡效应。

[1052] 167.一种根据实施例1至67、实施例88至98和实施例101至159中任一项所述的药物组合物在制造用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的药物中的用途,其中该细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:非霍奇金淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞淋巴瘤、脾脏弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特(Burkitt)淋巴瘤之间的特征之B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金氏淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、在HHV8相关多中心卡斯尔曼病中引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性髓系白血病(AML)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrommacroglobulinemia,WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤

(Burkitt's lymphoma,BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾脏淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞性淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。

[1053] 168.根据实施例1至67、实施例88至98和实施例101至159中任一项所述的药物组合物,其用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中该细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:非霍奇金淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞淋巴瘤、脾脏弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特(Burkitt)淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金氏淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、生发中心B细胞样(GCB)弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、活化B细胞样(ABC)DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、在HHV8相关多中心卡斯尔曼病中引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性髓系白血病(AML)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、淋巴浆细胞性淋巴瘤(LL)、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia,WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma,BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾脏淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞性淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。

[1054] 169.根据实施例168或169所述的用途或供使用的药物组合物,其中该癌症为DLBCL、GCB DLBCL、ABC DLBCL、FL、MCL、AML、CLL、MZL、SLL、LL、WM、CNSL或BL。

[1055] 170.一种根据实施例1至57、实施例78至97、实施例100和实施例116至159中任一项所述的药物组合物在制造用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的药物中的用途,其中该细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤(MM)、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。

[1056] 171.根据实施例1至57、实施例78至97、实施例100和实施例116至159中任一项所述的药物组合物,其用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中该细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤(MM)、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。

[1057] 172.根据实施例170或171所述的用途或供使用的药物组合物,其中该癌症为HER2阳性癌症。

[1058] 173.根据实施例1至57、实施例68至77、实施例88至97、实施例99和实施例116至

159中任一项所述的药物组合物在制造用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的药物中的用途,其中该细胞增殖性疾患为选自以下的癌症:多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、急性髓系白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓系白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病(APL)、慢性骨髓增殖性疾患、血小板性白血病、前体B细胞急性淋巴细胞白血病(pre-B-ALL)、前体T细胞急性淋巴细胞白血病(pre-T-ALL)、肥大细胞病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、髓系肉瘤、淋巴细胞白血病和未分化白血病。

[1059] 174.根据实施例1至57、实施例68至77、实施例88至97、实施例99和实施例116至159中任一项所述的药物组合物,其用于治疗细胞增殖性疾患或延迟其进展,或用于增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能,其中该细胞增殖性疾患为选自以下的癌症:多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、急性髓系白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓系白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病(APL)、慢性骨髓增殖性疾患、血小板性白血病、前体B细胞急性淋巴细胞白血病(pre-B-ALL)、前体T细胞急性淋巴细胞白血病(pre-T-ALL)、肥大细胞病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、髓系肉瘤、淋巴细胞白血病和未分化白血病。

[1060] 175.根据实施例173或174所述的用途或供使用的药物组合物,其中该癌症为FcRH5阳性癌症。

[1061] 176.根据实施例161至175中任一项所述的用途或供使用的药物组合物,其中该治疗性蛋白质为被配制用于以约10μg至约100mg的剂量向该受试者施用的双特异性抗体。

[1062] 177.根据实施例176所述的用途或供使用的药物组合物,其中该治疗性蛋白质为被配制用于以约1mg至约60mg的剂量向该受试者施用的双特异性抗体。

[1063] 178.根据实施例161至177中任一项所述的用途或供使用的药物组合物,其中该受试者待被共同施用至少一种另外的治疗剂。

[1064] 179.根据实施例178所述的用途或供使用的药物组合物,其中该至少一种另外的治疗剂包含PD-1轴结合拮抗剂。

[1065] 180.根据实施例179所述的用途或供使用的药物组合物,其中该PD-1轴结合拮抗剂选自由以下项组成的组:PD-L1结合拮抗剂、PD-1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[1066] 181.根据实施例180所述的用途或供使用的药物组合物,其中该PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。

[1067] 182.根据实施例181所述的用途或供使用的药物组合物,其中该PD-L1结合拮抗剂选自由以下项组成的组:阿特珠单抗(MPDL3280A)、MDX-1105(BMS-936559)和MEDI4736(德瓦鲁单抗)。

[1068] 183.根据实施例180所述的用途或供使用的药物组合物,其中该PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。

[1069] 184.根据实施例183所述的用途或供使用的药物组合物,其中该PD-1结合拮抗剂选自由以下项组成的组:MDX-1106(纳武单抗)、MK-3475(派姆单抗)、AMG 404、REGN2810(西米普利单抗)和AMP-224。

[1070] 185.根据实施例180所述的用途或供使用的药物组合物,其中该PD-1轴结合拮抗剂为PD-L2结合拮抗剂。

[1071] 186.根据实施例185所述的用途或供使用的药物组合物,其中该PD-L2结合拮抗剂为抗体或免疫粘附素。

[1072] 187.根据实施例178所述的用途或供使用的药物组合物,其中该至少一种另外的治疗剂包含奥妥珠单抗、利妥昔单抗、皮质类固醇或托珠单抗。

[1073] 188.根据实施例178所述的用途或供使用的药物组合物,其中该至少一种另外的治疗剂包含抗体-药物缀合物(ADC)

[1074] 189.根据实施例188所述的用途或供使用的药物组合物,其中该ADC为抗CD79b ADC。

[1075] 190.根据实施例189所述的用途或供使用的药物组合物,其中该抗CD79b ADC为维泊妥珠单抗。

[1076] 191.根据实施例161至190中任一项所述的用途或供使用的药物组合物,其中该受试者为人。

[1077] 192.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的根据实施例1至159中任一项所述的药物组合物。

[1078] 193.一种增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的根据实施例1至159中任一项所述的药物组合物。

[1079] 194.根据实施例192或193所述的方法,其中该细胞增殖性疾患为癌症。

[1080] 195.根据实施例192至194中任一项所述的方法,其中该治疗性蛋白质为被配制以与位于免疫效应细胞上的CD3分子和位于除了免疫效应细胞外的靶标细胞上的靶标分子结合的双特异性抗体。

[1081] 196.根据实施例195所述的方法,其中该双特异性抗体在与该CD3分子和与该靶标分子结合后活化该免疫效应细胞。

[1082] 197.根据实施例196所述的方法,其中活化的免疫效应细胞能够对该靶标细胞施加细胞毒性效应和/或细胞凋亡效应。

[1083] 198.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展或增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的根据实施例1至67、实施例88至98和实施例101至159中任一项所述的药物组合物,其中该细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:NHL、CLL、B细胞淋巴瘤、脾脏弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与典型霍奇金氏淋巴瘤之间的特征的B细胞淋巴瘤、DLBCL、GCB DLBCL、ABC DLBCL、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLBCL、原发性皮肤DLBCL(腿型)、老年人的EBV阳性DLBCL、与慢性炎症相关的DLBCL、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、在HHV8相关多中心卡斯尔曼病中引起的大B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、FL、MCL、AML、MZL、SLL、LL、WM、CNSL、BL、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、脾脏淋巴瘤/白血病、变异型毛细胞白血病、α重链病、γ重链病、μ重链病、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、MALT淋巴瘤、淋巴结边缘区淋巴瘤、小儿淋巴结边缘

区淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、浆母细胞性淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。

[1084] 199.根据实施例197所述的方法,其中该癌症为DLBCL、GCB DLBCL、ABC DLBCL、FL、MCL、AML、CLL、MZL、SLL、LL、WM、CNSL或BL。

[1085] 200.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展或增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的根据实施例1至57、实施例78至97、实施例100和实施例116至159中任一项所述的药物组合物,其中该细胞增殖性疾患为选自由以下项组成的组的癌症:乳腺癌、结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤(MM)、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈部癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和胶质母细胞瘤。

[1086] 201.根据实施例200所述的方法,其中该癌症为HER2阳性癌症。

[1087] 202.一种治疗有此需要的受试者的细胞增殖性疾患或延迟其进展或增强患有细胞增殖性疾患的受试者的免疫功能的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的根据实施例1至57、实施例68至77、实施例88至97、实施例99和实施例116至159中任一项所述的药物组合物,其中该细胞增殖性疾患为选自由以下组成的组的癌症:多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、急性髓系白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性髓系白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病(APL)、慢性骨髓增殖性疾患、血小板性白血病、前体B细胞急性淋巴细胞白血病(pre-B-ALL)、前体T细胞急性淋巴细胞白血病(pre-T-ALL)、肥大细胞病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、髓系肉瘤、淋巴细胞白血病和未分化白血病。

[1088] 203.根据实施例202所述的方法,其中该癌症为FcRH5阳性癌症。

[1089] 204.根据实施例192至203中任一项所述的方法,其中该治疗性蛋白质为双特异性抗体并且以约10μg至约100mg的剂量向该受试者施用。

[1090] 205.根据实施例204所述的方法,其中该治疗性蛋白质以约1mg至约60mg的剂量向该受试者施用。

[1091] 206.根据实施例192至205中任一项所述的方法,其中该受试者被共同施用至少一种另外的治疗剂。

[1092] 207.根据实施例206所述的方法,其中该至少一种另外的治疗剂包含PD-1轴结合拮抗剂。

[1093] 208.根据实施例207所述的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂选自由以下项组成的组:PD-L1结合拮抗剂、PD-1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[1094] 209.根据实施例208所述的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。

[1095] 210.根据实施例209所述的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂选自由以下项组成的组:阿特珠单抗(MPDL3280A)、MDX-1105(BMS-936559)和MEDI4736(德瓦鲁单抗)。

[1096] 211.根据实施例208所述的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。

[1097] 212.根据实施例211所述的方法,其中该PD-1结合拮抗剂选自由以下项组成的组:MDX-1106(纳武单抗)、MK-3475(派姆单抗)、AMG 404、REGN2810(西米普利单抗)和AMP-224。

[1098] 213.根据实施例208所述的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂为PD-L2结合拮抗剂。

[1099] 214.根据实施例213所述的方法,其中该PD-L2结合拮抗剂为抗体或免疫粘附素。

[1100] 215.根据实施例206所述的方法,其中该至少一种另外的治疗剂包含奥妥珠单抗、利妥昔单抗、皮质类固醇或托珠单抗。

[1101] 216.根据实施例206所述的方法,其中该至少一种另外的治疗剂包含ADC。

[1102] 217.根据实施例216所述的方法,其中该ADC为抗CD79b ADC。

[1103] 218.根据实施例217所述的方法,其中该抗CD79b ADC为维泊妥珠单抗。

[1104] 219.根据实施例192至218中任一项所述的方法,其中该药物组合物经静脉内施用。

[1105] 220.根据实施例192至219中任一项所述的方法,其中受试者为人。

[1106] 其他实施例

[1107] 尽管为了清楚理解的目的先前已通过举例说明和实例相当详细地描述了本公开,但是这些描述和实例不应解释为限制本公开的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容均全文以引用方式明确地并入。

		I期制剂的所需改变			优点			缺点		
		蛋白质浓度	表面活性剂浓度	抗氧化剂（L-蛋氨酸）	剂量的灵活性	一致性/易用性	可利用I期数据	所需的稀释剂	IV袋尺寸CD8隔离方案：限制	DP废液
制剂选项										
1	1 mg/mL DP，具高表面活性剂浓度	X	X	X	X	X				
2	1 mg/mL DP，具低表面活性剂浓度	X	X	X	X			X		
3	60 mg/mL DP，具低表面活性剂浓度					X	X	X		X
4	10 mg/mL DP，具高表面活性剂浓度	X	X					X	X	X
5	10 mg/mL DP，具低表面活性剂浓度	X	X			X		X		X
递送选项										
6	具有 60 mg/mL DP 的注射泵					X	X	X		X
7	用 60 mg/mL DP 去除 IV 袋顶部空间							X		X
8	用 10 mg/mL DP 去除 IV 袋顶部空间	X	X							X

图1

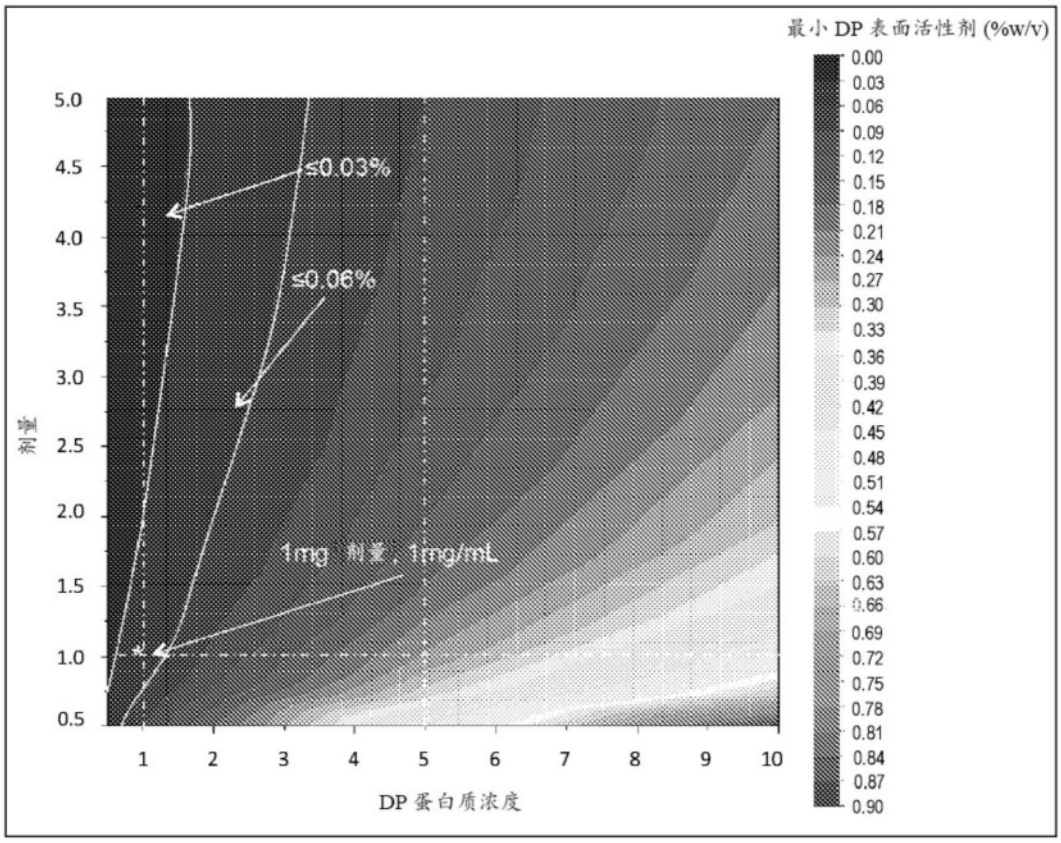

最小 DP 表面活性剂 (%w/v)
0.00
0.03
0.06
0.09
0.12
0.15
0.18
0.21
0.24
0.27
0.30
0.33
0.36
0.39
0.42
0.45
0.48
0.51
0.54
0.57
0.60
0.63
0.66
0.69
0.72
0.75
0.78
0.81
0.84
0.87
0.90
≤0.03%
≤0.06%
1mg 剂量，1mg/mL
剂量
DP 蛋白质浓度
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

图2

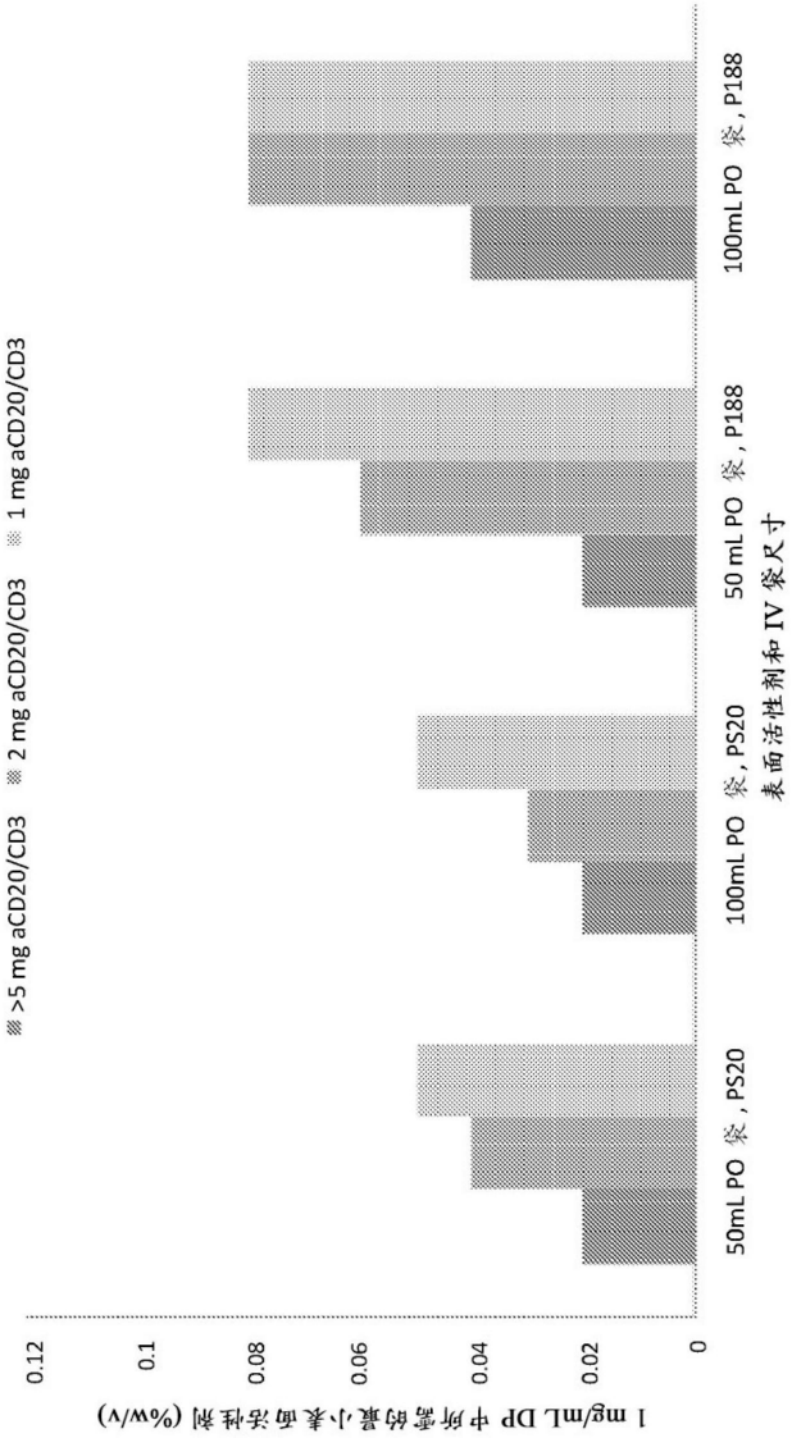

1 mg/mL DP 中所需的最小表面活性剂 (%w/v)
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
>5 mg aCD20/CD3
2 mg aCD20/CD3
1 mg aCD20/CD3
50mL PO 杂，PS20
100mL PO 杂，PS20
50 mL PO 杂，P188
100mL PO 杂，P188
表面活性剂和 IV 袋尺寸

图3

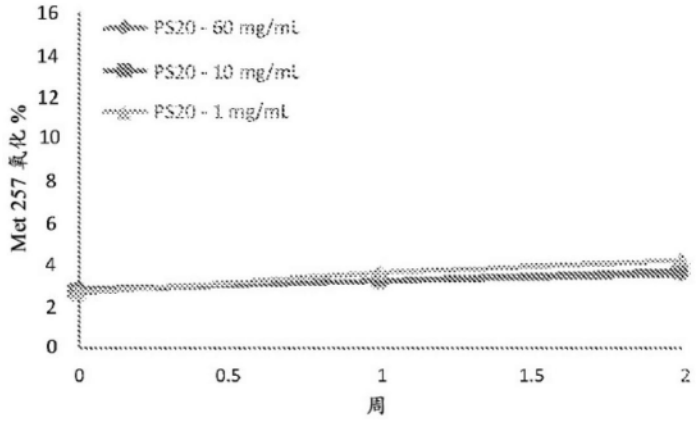

PS20 - 60 mg/mL
PS20 - 10 mg/mL
PS20 - 1 mg/mL
Met 257 氧化 %
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
0.5
1
1.5
2
周

图4A

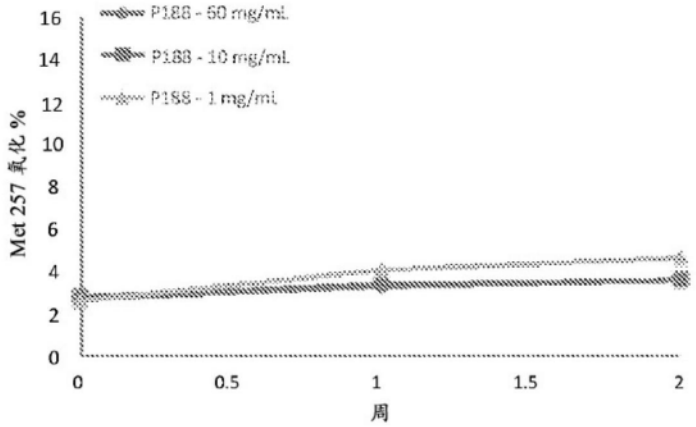

P188 - 60 mg/mL
P188 - 10 mg/mL
P188 - 1 mg/mL
Met 257 氧化 %
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
0.5
1
1.5
2
周

图4B

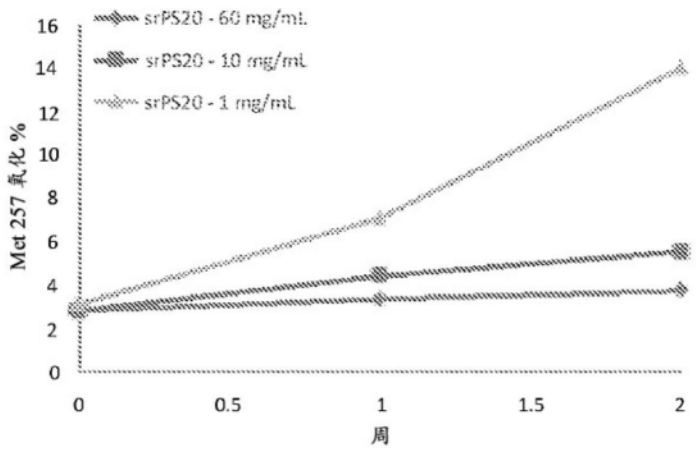

srPS20 - 60 mg/mL
srPS20 - 10 mg/mL
srPS20 - 1 mg/mL
Met 257 氧化 %
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
0.5
1
1.5
2
周

图4C

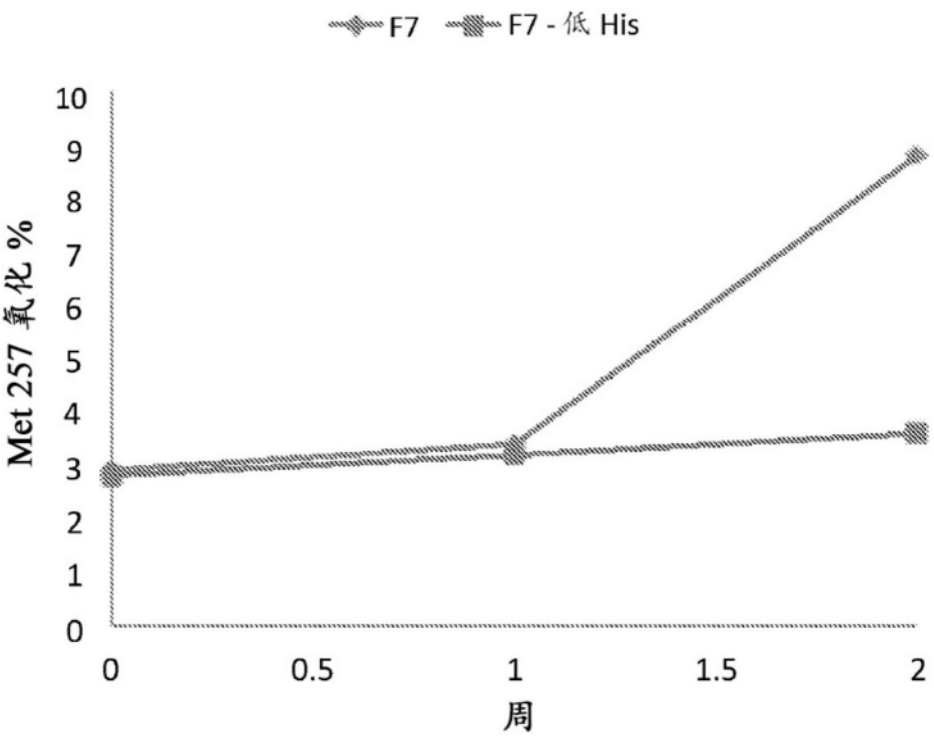


图5

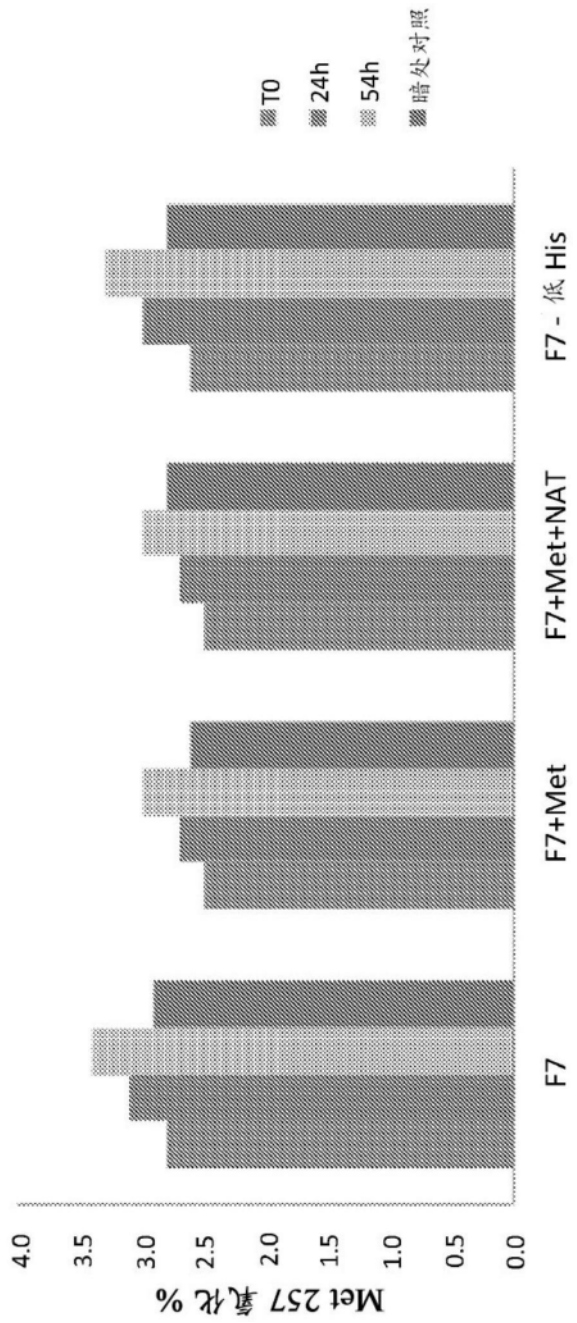

T0
24h
54h
暗处对照
F7
F7+Met
F7+Met+NAT
F7 - 低 His
Met 257 氧化 %
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

图6

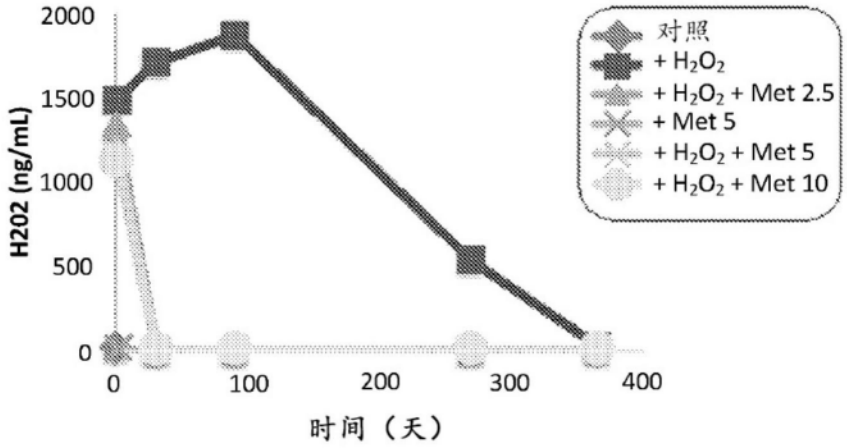

2000
1500
1000
500
0
H202 (ng/mL)
0
100
200
300
400
时间（天）
对照
+ H_2O_2
+ H_2O_2 + Met 2.5
+ Met 5
+ H_2O_2 + Met 5
+ H_2O_2 + Met 10

图7A

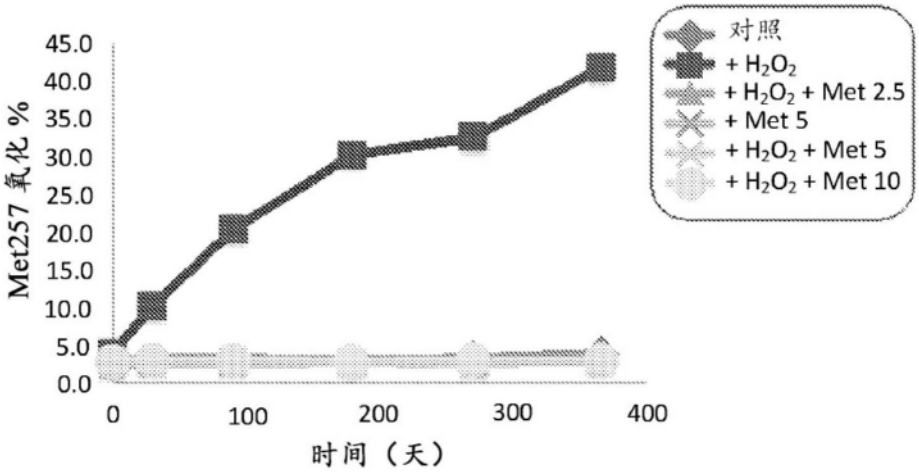

45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Met257 氧化 %
0
100
200
300
400
时间（天）
对照
+ H_2O_2
+ H_2O_2 + Met 2.5
+ Met 5
+ H_2O_2 + Met 5
+ H_2O_2 + Met 10

图7B

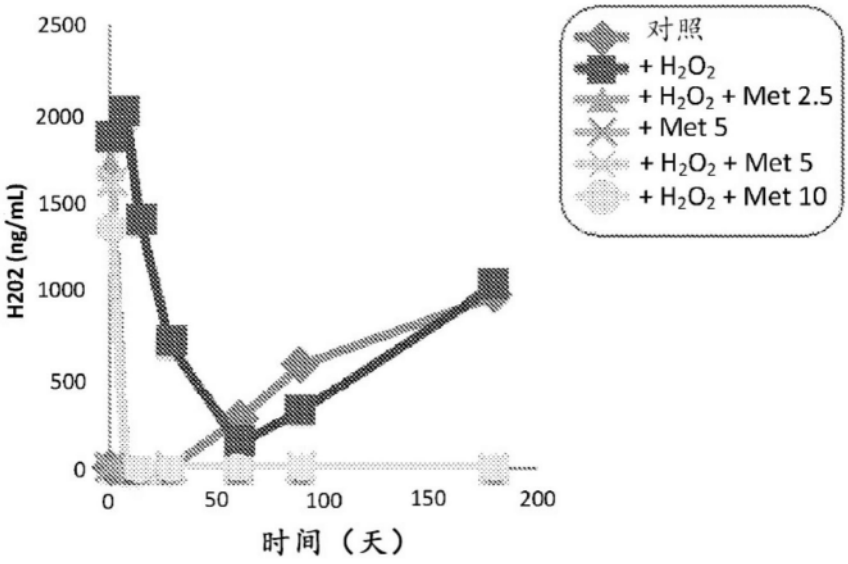

2500
2000
1500
1000
500
0
H202 (ng/mL)
0
50
100
150
200
时间（天）
对照
+ H_2O_2
+ H_2O_2 + Met 2.5
+ Met 5
+ H_2O_2 + Met 5
+ H_2O_2 + Met 10

图8A

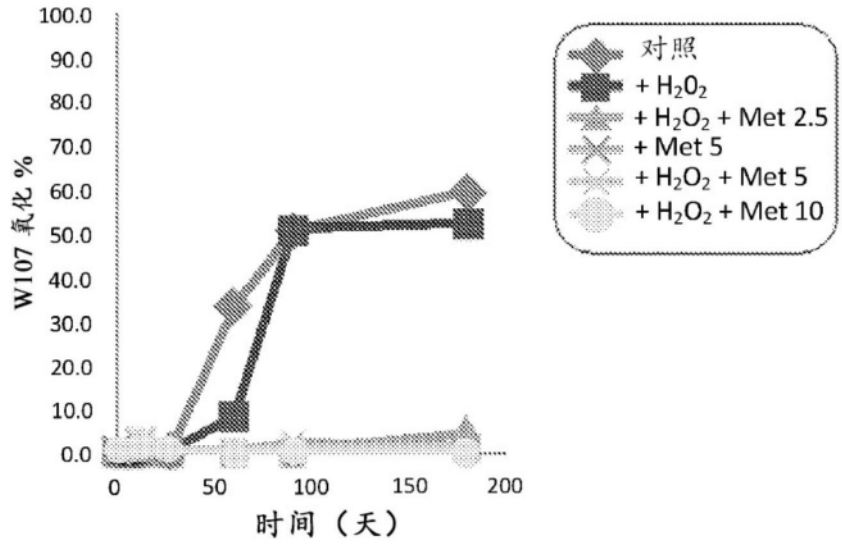

100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
W107 氧化 %
0
50
100
150
200
时间（天）
对照
+ H_2O_2
+ H_2O_2 + Met 2.5
+ Met 5
+ H_2O_2 + Met 5
+ H_2O_2 + Met 10

图8B

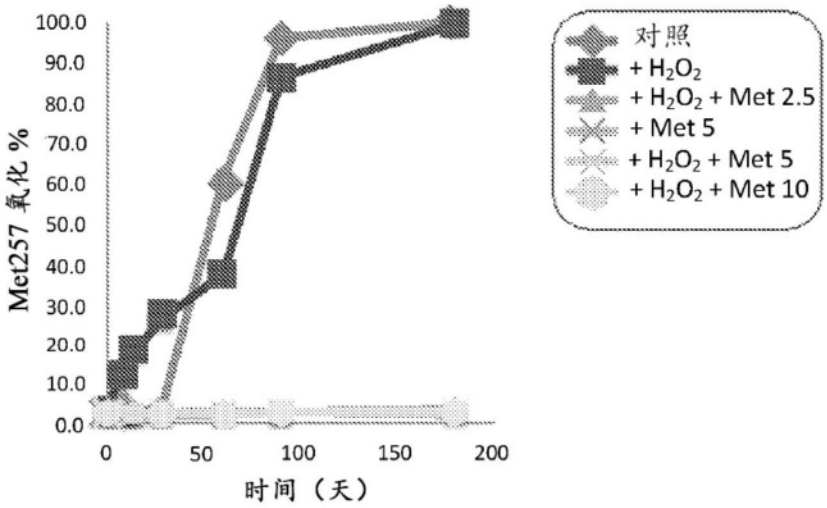

Met257 氧化 %
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
0
50
100
150
200
时间（天）
对照
+ H_2O_2
+ H_2O_2 + Met 2.5
+ Met 5
+ H_2O_2 + Met 5
+ H_2O_2 + Met 10

图8C

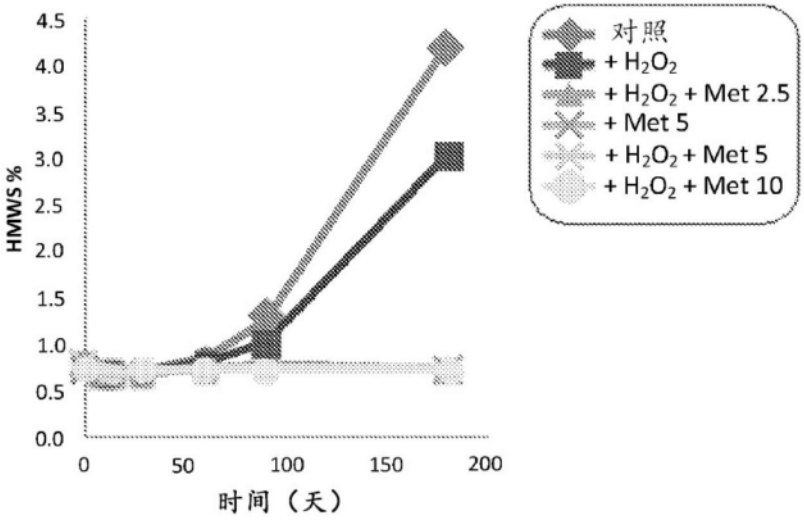

HMWS %
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
50
100
150
200
时间（天）
对照
+ H_2O_2
+ H_2O_2 + Met 2.5
+ Met 5
+ H_2O_2 + Met 5
+ H_2O_2 + Met 10

图8D

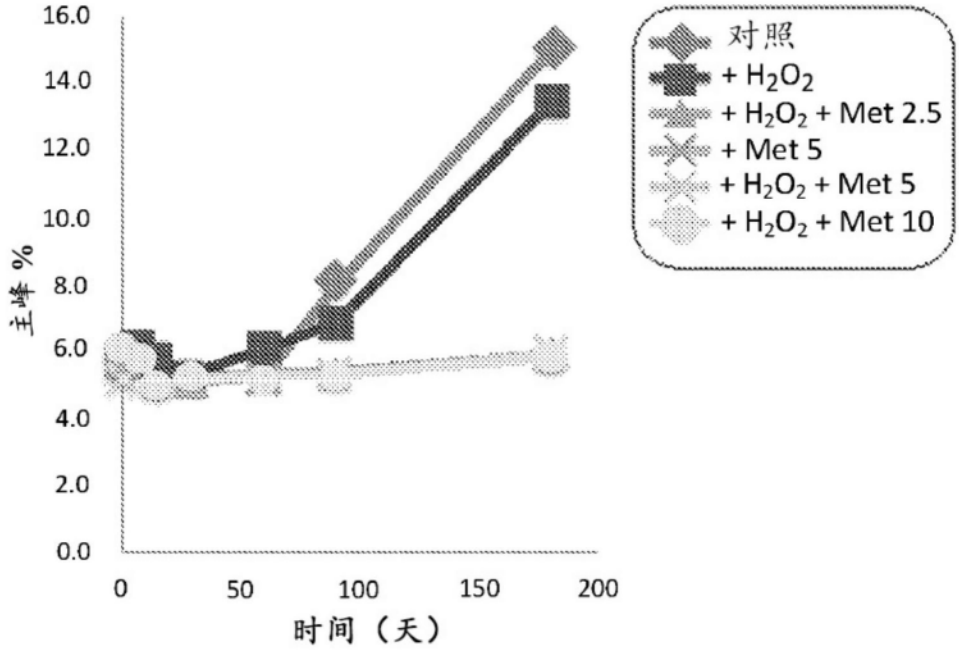

16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
主峰 %
0
50
100
150
200
时间（天）
对照
+ H_2O_2
+ H_2O_2 + Met 2.5
+ Met 5
+ H_2O_2 + Met 5
+ H_2O_2 + Met 10

图8E

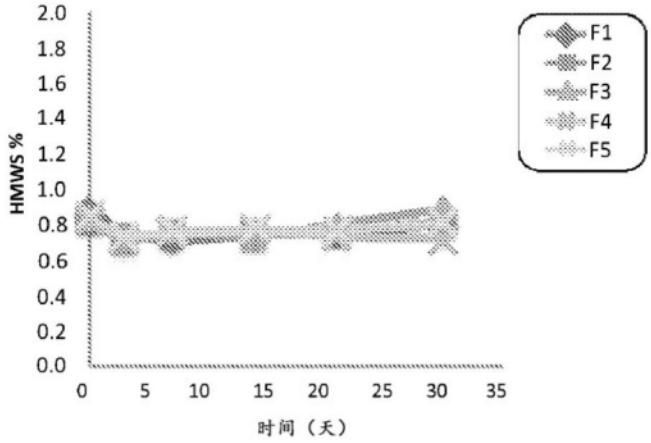

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
HMWS %
0
5
10
15
20
25
30
35
时间（天）
F1
F2
F3
F4
F5

图9A

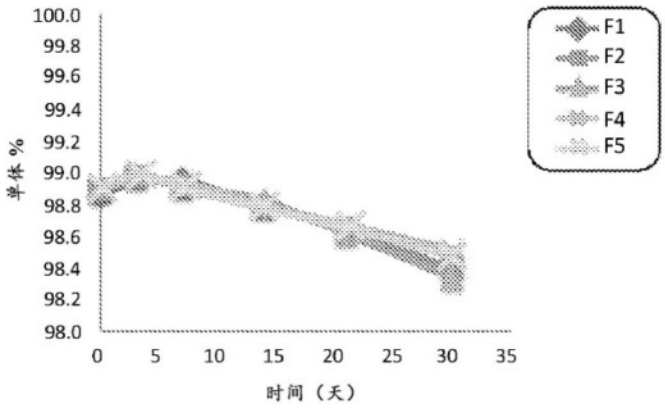

100.0
99.8
99.6
99.4
99.2
99.0
98.8
98.6
98.4
98.2
98.0
单体 %
0 5 10 15 20 25 30 35
时间（天）
F1
F2
F3
F4
F5

图9B

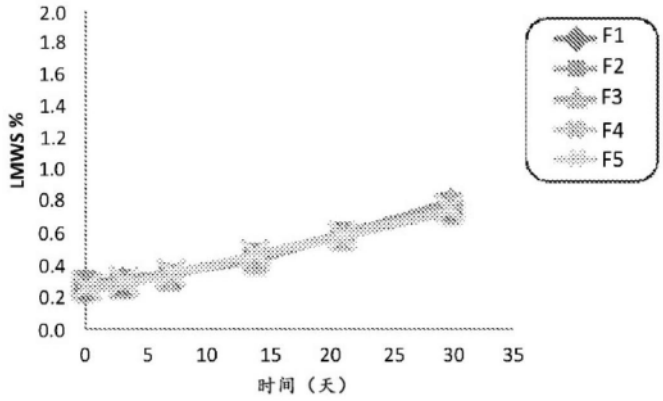

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
LMWS %
0 5 10 15 20 25 30 35
时间（天）
F1
F2
F3
F4
F5

图9C

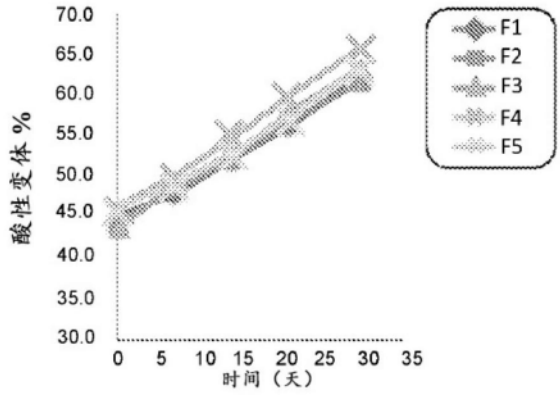

70.0
65.0
60.0
55.0
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
酸性变体 %
0 5 10 15 20 25 30 35
时间（天）
F1
F2
F3
F4
F5

图10A

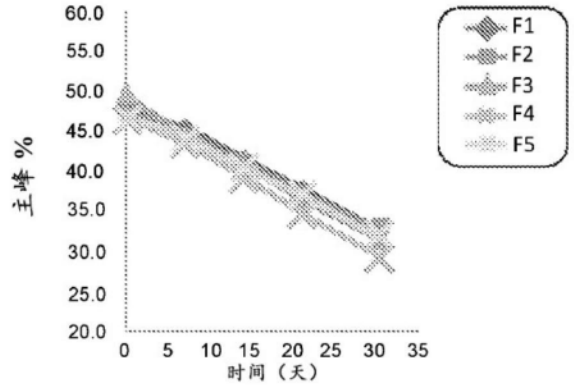


图10B

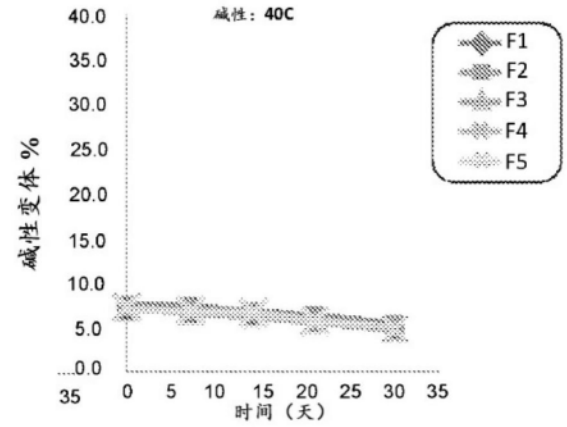


图10C

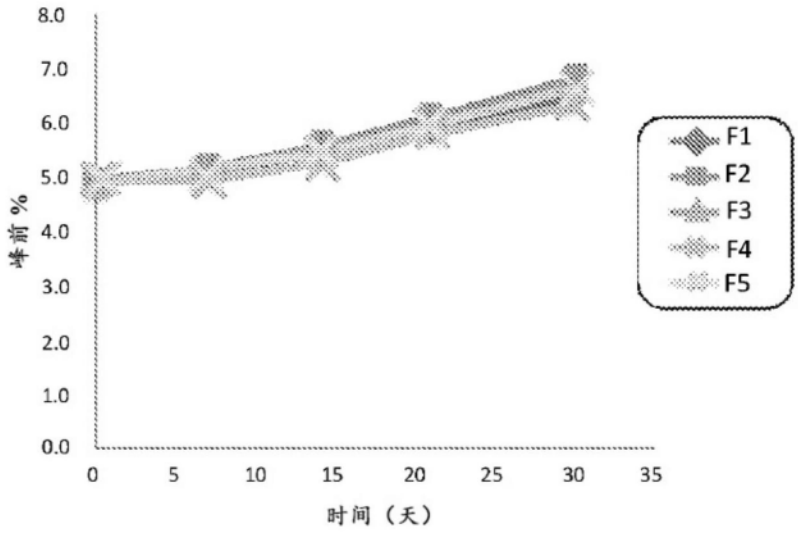


图11A

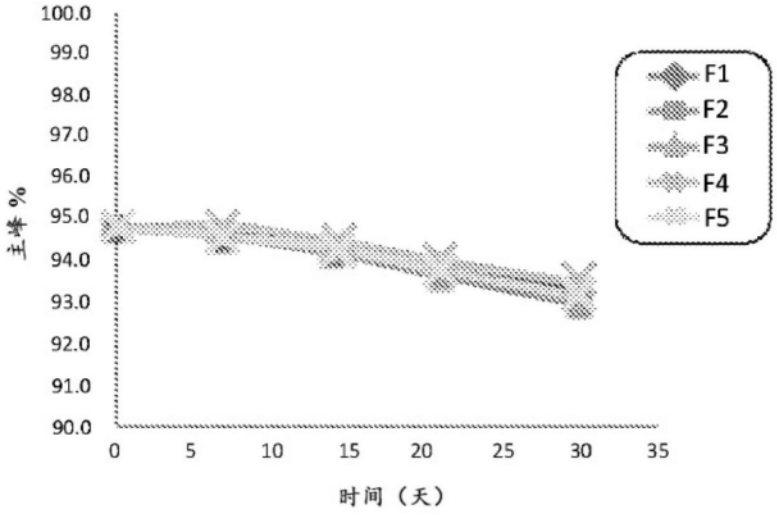

100.0
99.0
98.0
97.0
96.0
95.0
94.0
93.0
92.0
91.0
90.0
主峰 %
0
5
10
15
20
25
30
35
时间（天）
F1
F2
F3
F4
F5

图11B

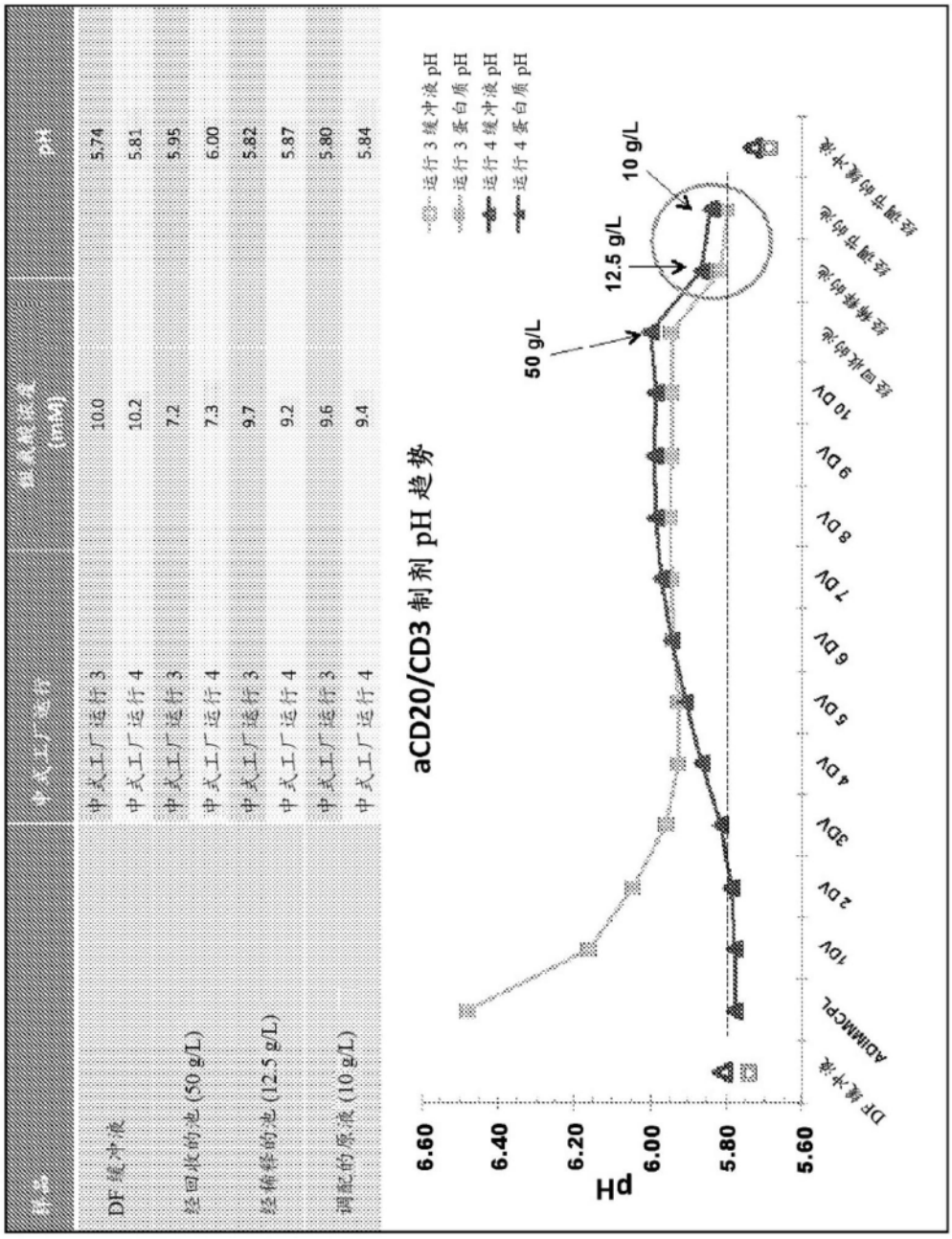

样品
中式工厂运行
蛋白质浓度 (mg/mL)
pH
DF 缓冲液
中式工厂运行 3
10.0
5.74
中式工厂运行 4
10.2
5.81
经回收的池 (50 g/L)
中式工厂运行 3
7.2
5.95
中式工厂运行 4
7.3
6.00
经稀释的池 (12.5 g/L)
中式工厂运行 3
9.7
5.82
中式工厂运行 4
9.2
5.87
调配的原液 (10 g/L)
中式工厂运行 3
9.6
5.80
中式工厂运行 4
9.4
5.84
aCD20/CD3 制剂 pH 趋势
运行 3 缓冲液 pH
运行 3 蛋白质 pH
运行 4 缓冲液 pH
运行 4 蛋白质 pH
50 g/L
12.5 g/L
10 g/L
pH
6.60
6.40
6.20
6.00
5.80
5.60
DF 缓冲液
ADIMMCPL
1DV
2 DV
3DV
4 DV
5 DV
6 DV
7 DV
8 DV
9 DV
10 DV
经回收的池
经稀释的池
经调节的池
经调节的缓冲液

图12

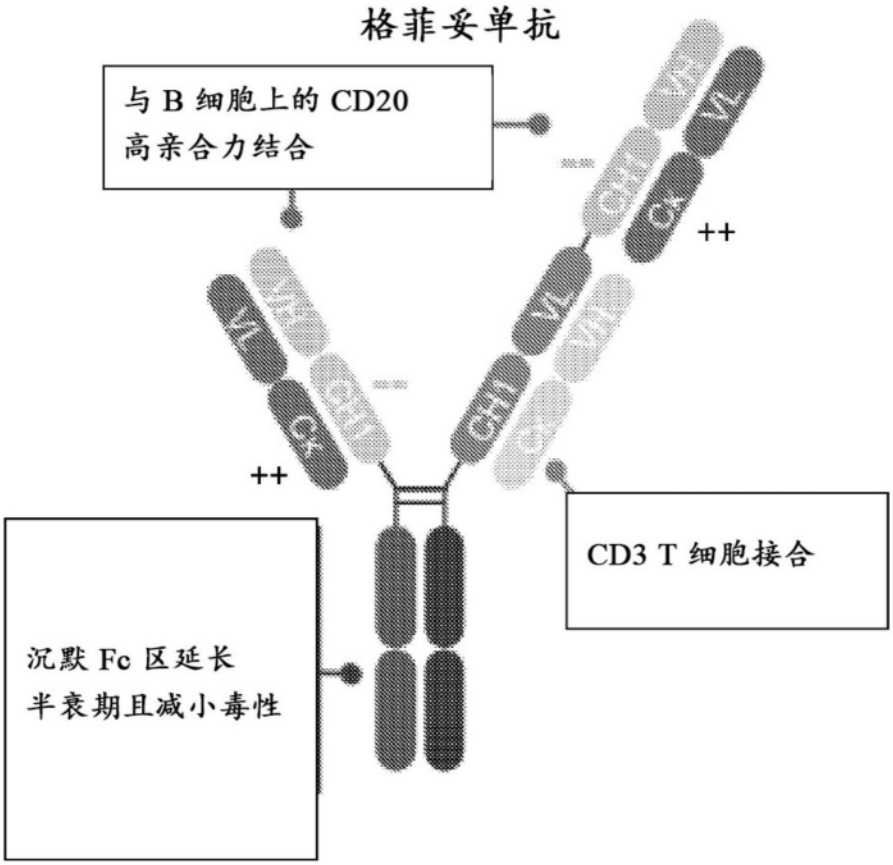

格菲妥单抗
与 B 细胞上的 CD20
高亲合力结合
VH
VL
CH1
Cκ
++
VH
VL
CH1
Cκ
++
沉默 Fc 区延长
半衰期且减小毒性
CD3 T 细胞接合

图13

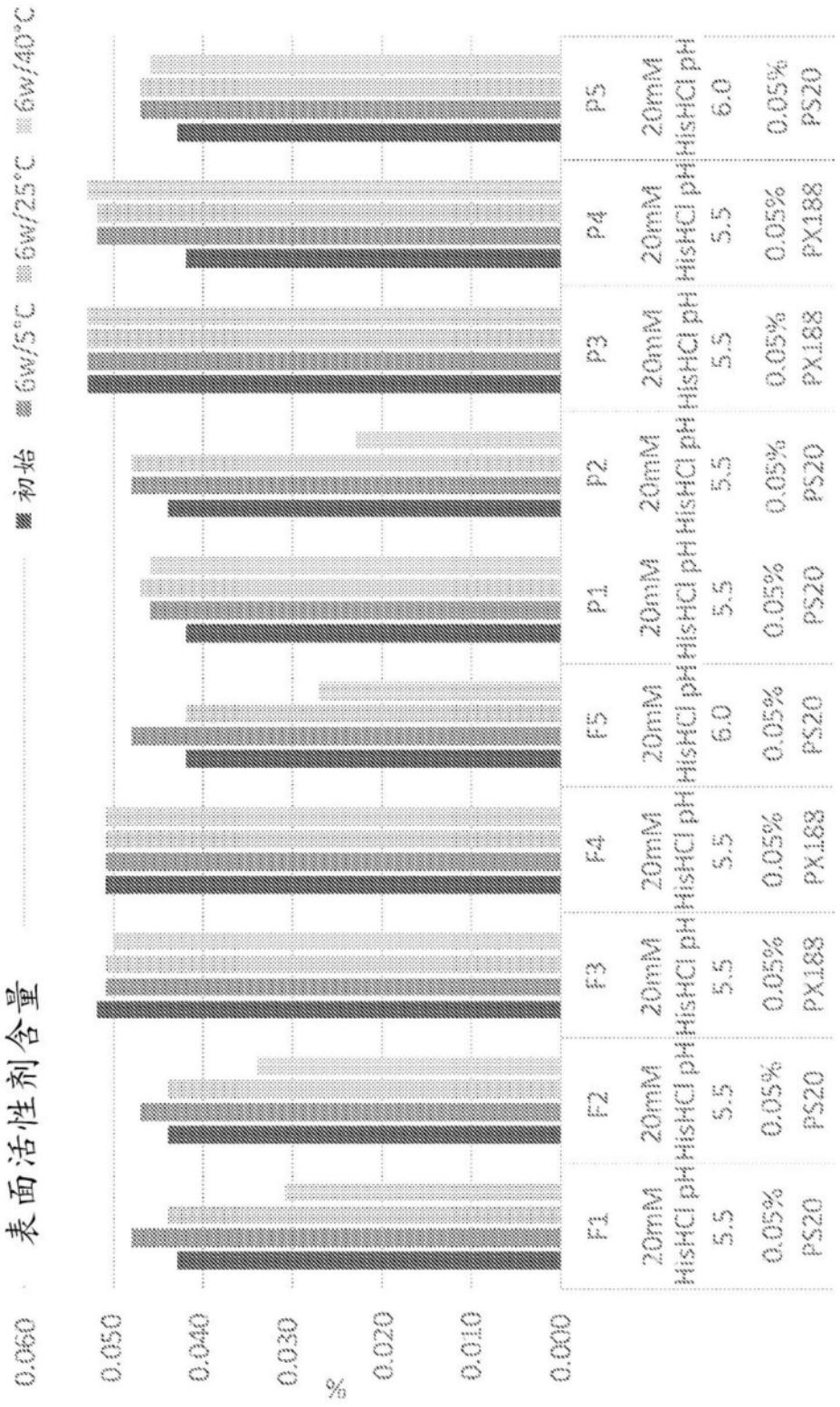

表面活性剂含量
初始
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C
%
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
F1 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PS20
F2 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PS20
F3 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PX188
F4 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PX188
F5 20mM HisHCl pH 6.0 0.05% PS20
P1 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PS20
P2 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PS20
P3 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PX188
P4 20mM HisHCl pH 5.5 0.05% PX188
P5 20mM HisHCl pH 6.0 0.05% PS20

图14

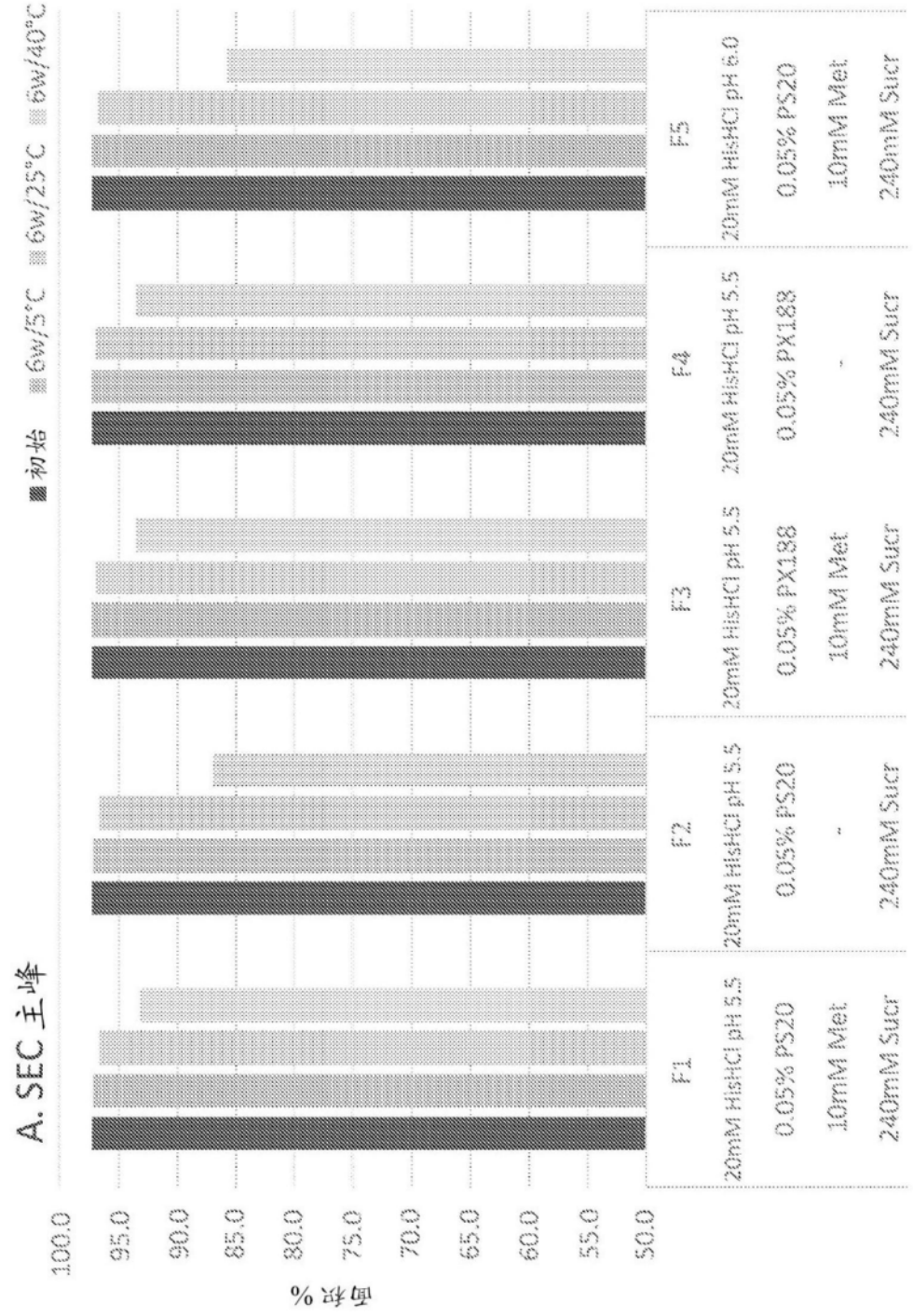

A. SEC 主峰
面积 %
100.0
95.0
90.0
85.0
80.0
75.0
70.0
65.0
60.0
55.0
50.0
初始
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr

图15A

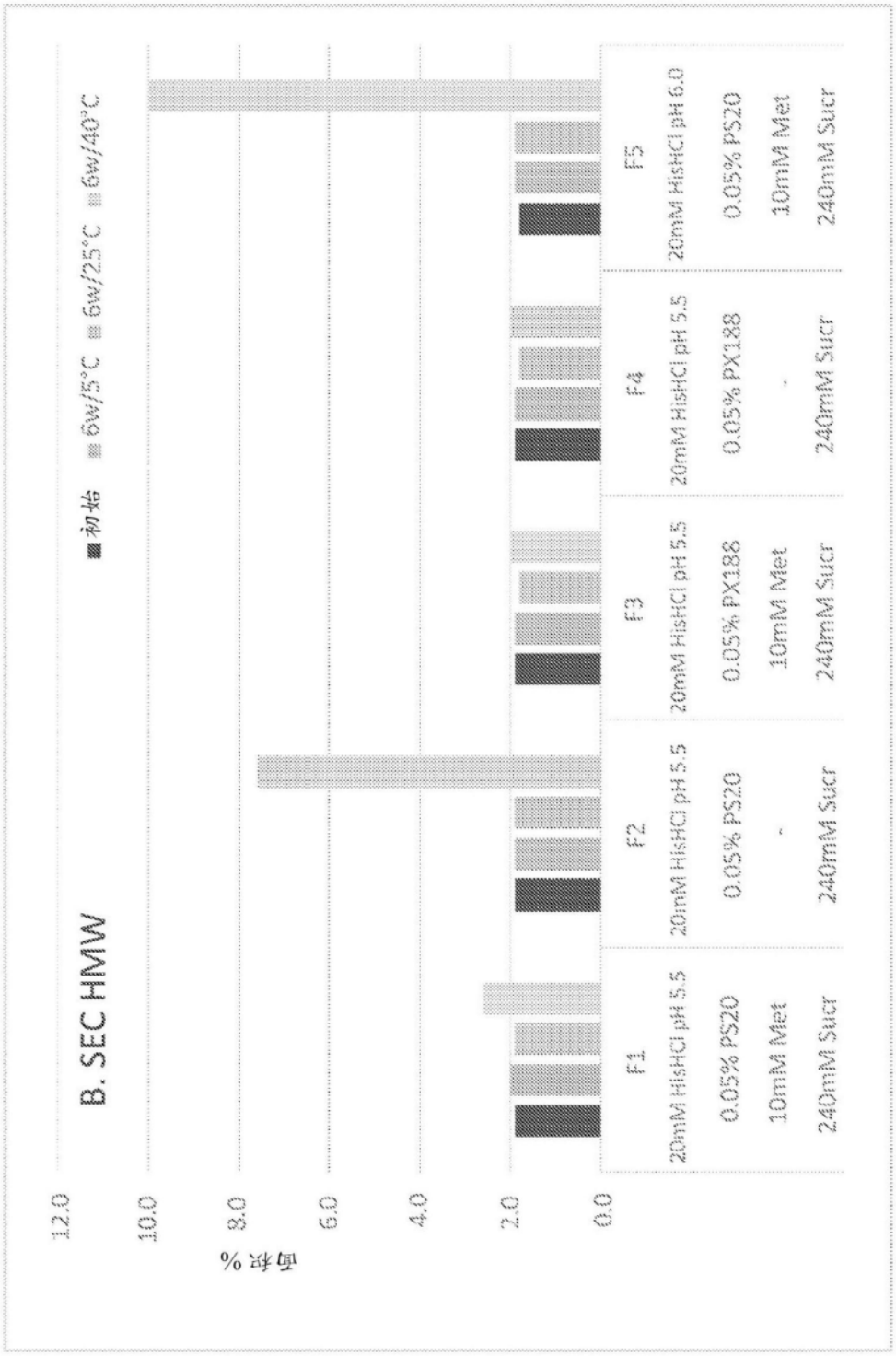

B. SEC HMW
面积 %
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
初始
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr

图15B


C. SEC LMW
面积 %
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
初始
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr

图15C

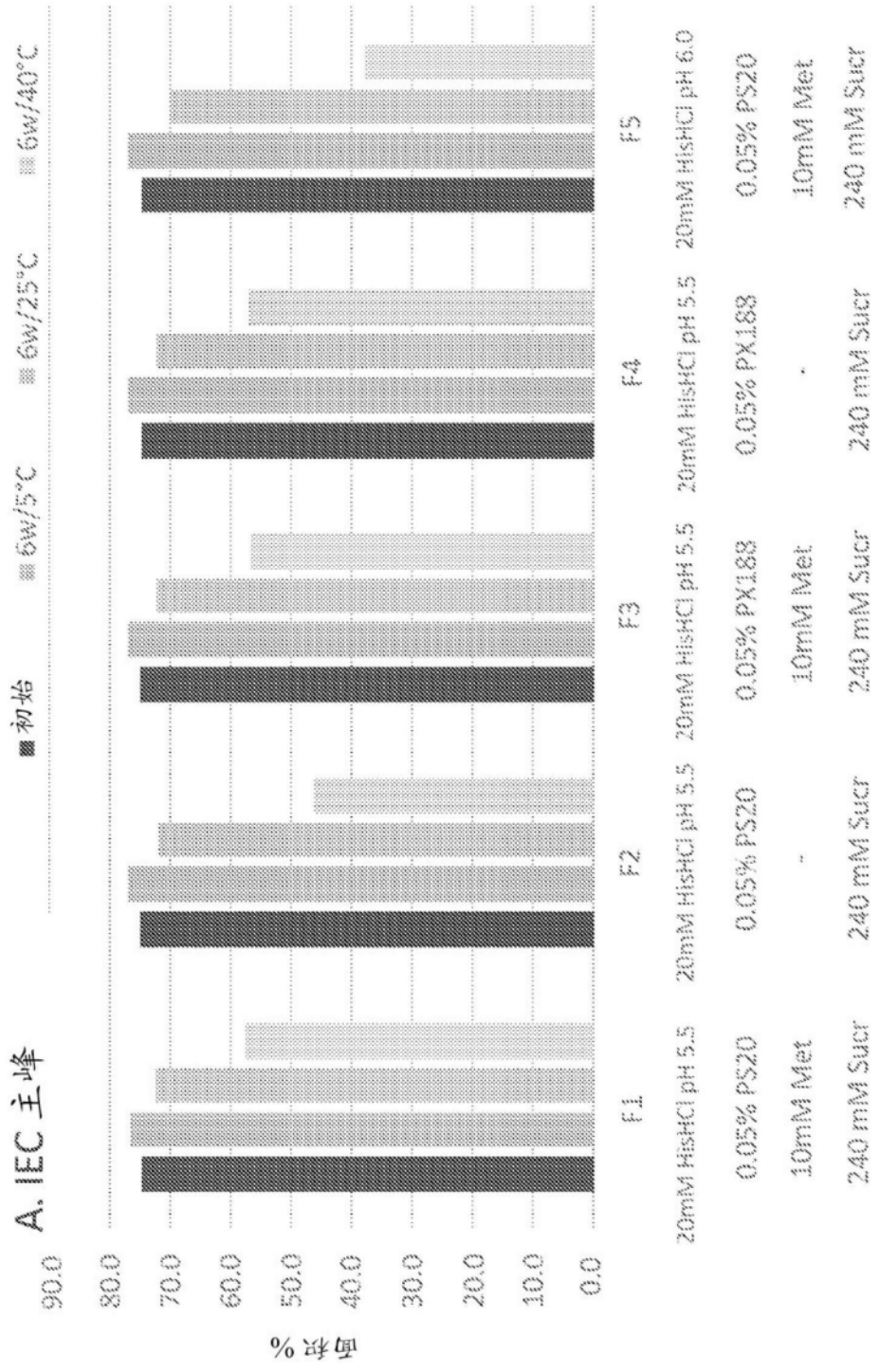

A. IEC 主峰
面积 %
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
初始
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C
F1
F2
F3
F4
F5
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240 mM Sucr
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240 mM Sucr
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240 mM Sucr
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240 mM Sucr
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240 mM Sucr

图16A


B. IEC 酸性
初始
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C
面积 %
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
F1
F2
F3
F4
F5
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr

图16B

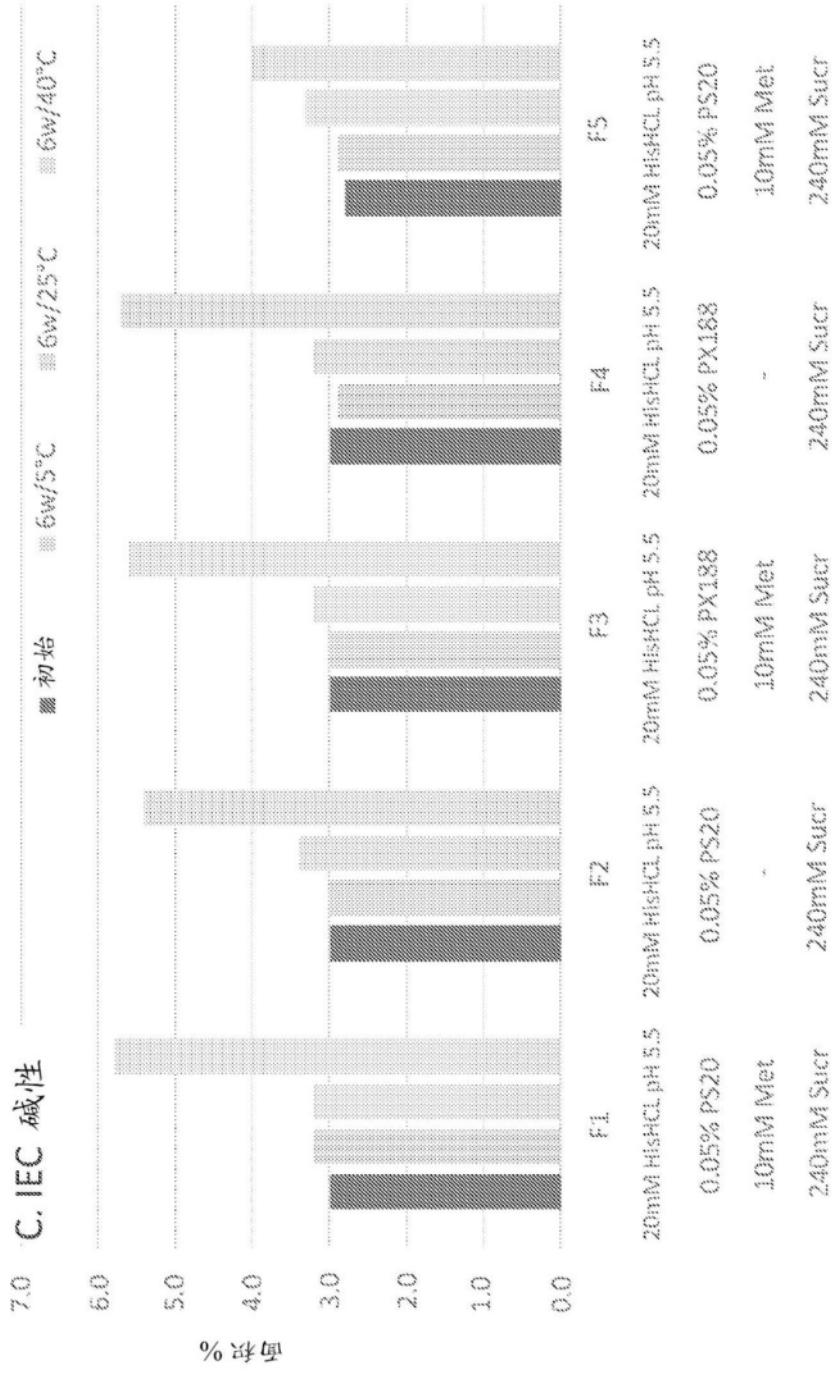

C. IEC 碱性
初始
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C
面积 %
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
F1
F2
F3
F4
F5
20mM HisHCL pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
20mM HisHCL pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
20mM HisHCL pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
20mM HisHCL pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
20mM HisHCL pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr

图16C

储存条件	储存时间（周）	浊度（FTU）	颜色	pH		渗透压（Osmol/kg）	可见颗粒（Seidenader）	可见颗粒（减法）	可见颗粒（EP 法）	亚可见颗粒		蛋白质浓度（mg/ml）	SEC (%)			IEC (%)		
										≥10μm/mL	≥25μm/mL		主要的	HMW	LMW	主要的	酸性	碱性
初始	-	2.7	B9	5.5		0.316	1	1	1	0	0	5.0	97.2	1.9	0.9	74.8	22.1	3.0
2-8°C	3	2.6	B9	5.4		0.317	0	0	0	0	0	5.1	97.0	2.0	1.0	76.6	20.2	3.2
	6	2.5	B9	5.5		0.320	0	0	0	0	0	5.0	97.1	2	1.0	76.5	20.30	3.2
	13	2.3	B9	5.5		0.318	0	0	0	0	0	5.1	97.2	1.9	0.9	74.8	22.7	2.5
	30	2.4	B9	5.5		0.319	0	0	0	0	0	5.1	96.3	1.9	1.8	74.1	23.4	2.5
	58	2.8	B9	5.5		0.318	>10	<7	>7	0	0	5.0	96.9	1.9	1.2	74.2	23.3	2.5
	84	3.2	B9	5.5		n/a	>10/>10	5/>10	>7/>7	0	0	5.0	96.7	1.8	1.5	73.8	23.6	2.6
25°C	3	2.5	B9	5.5		0.317	0	0	0	0	0	5.0	96.8	2.0	1.2	76.6	20.1	3.3
	6	2.6	B9	5.5		0.321	0	0	0	0	0	5.0	96.7	1.9	1.4	72.3	24.50	3.2
	13	2.4	B9	5.5		0.319	5	1	0	0	0	5.1	96.6	1.8	1.6	72.1	24.9	3.0
	30	5.2	B8	5.4		0.320	>10	>7	>7	0	0	5.1	95.7	2	2.3	66.0	30.4	3.6
	84	11.0	B7	5.4		n/a	>10/>10	>10/>10	>7/>7	18	1	5.0	90.2	3.6	6.1	47.6	48.1	4.3
40°C	3	2.5	B9	5.5		0.323	0	0	0	0	0	5.0	95.0	2.0	3.1	64.5	30.7	4.8
	6	4.1	B8	5.4		0.326	0	0	0	6	0	5.0	93.1	2.6	4.3	57.6	36.70	5.8
	13	8.8	B7	5.5		0.334	>10	0	0	5	0	5.1	84.0	8.8	7.2	41.7	52.6	5.6
振摇	2-8°C	2.5	B9	n/a		n/a	0	0	0	20	0	5.1	97.3	1.8	0.9	68.5	28.3	3.2
振摇	25°C	2.5	B9	n/a		n/a	0	0	0	28	0	5.1	97.2	1.8	1.0	69.6	27.2	3.2
冻/融	5 个周期	2.8	B9	n/a		n/a	0	0	0	0	0	5.1	97.2	1.8	1.0	69.3	27.5	3.1

图17

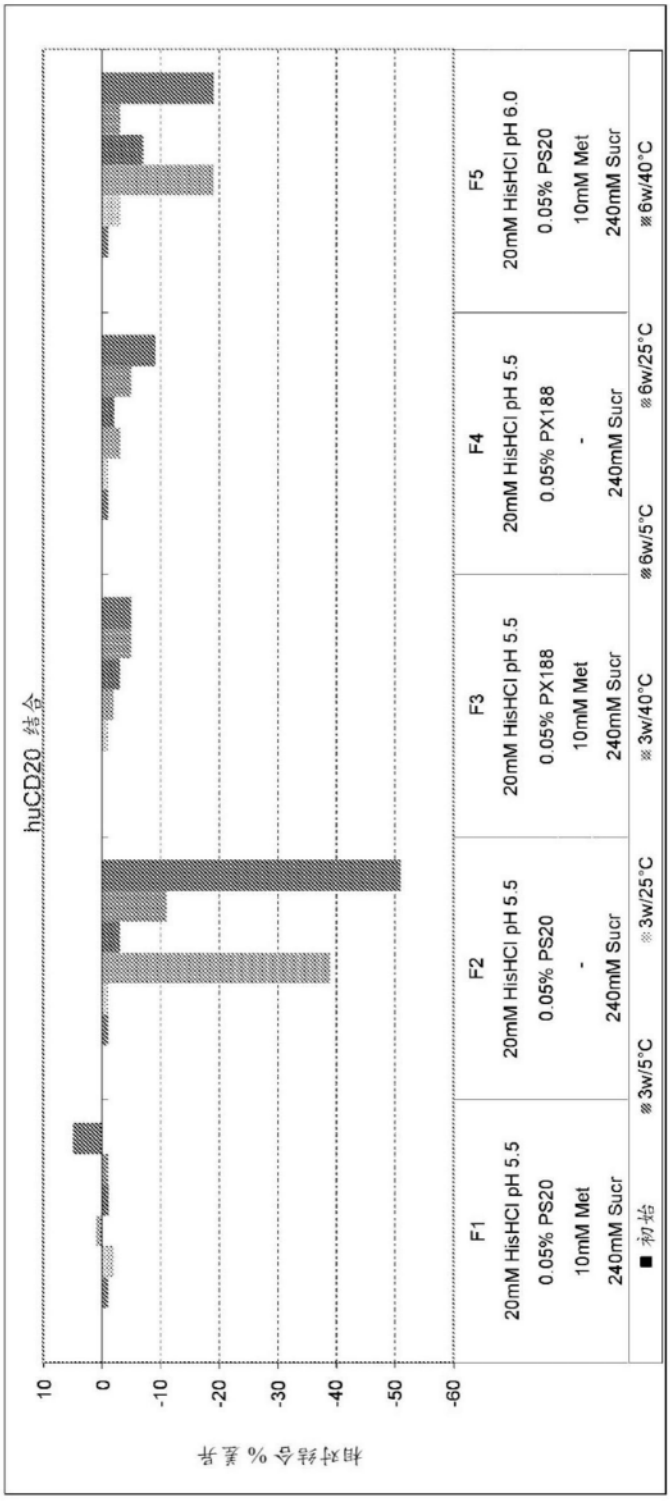

huCD20 结合
相对结合% 差异
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
初始
3w/5°C
3w/25°C
3w/40°C
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

图18A

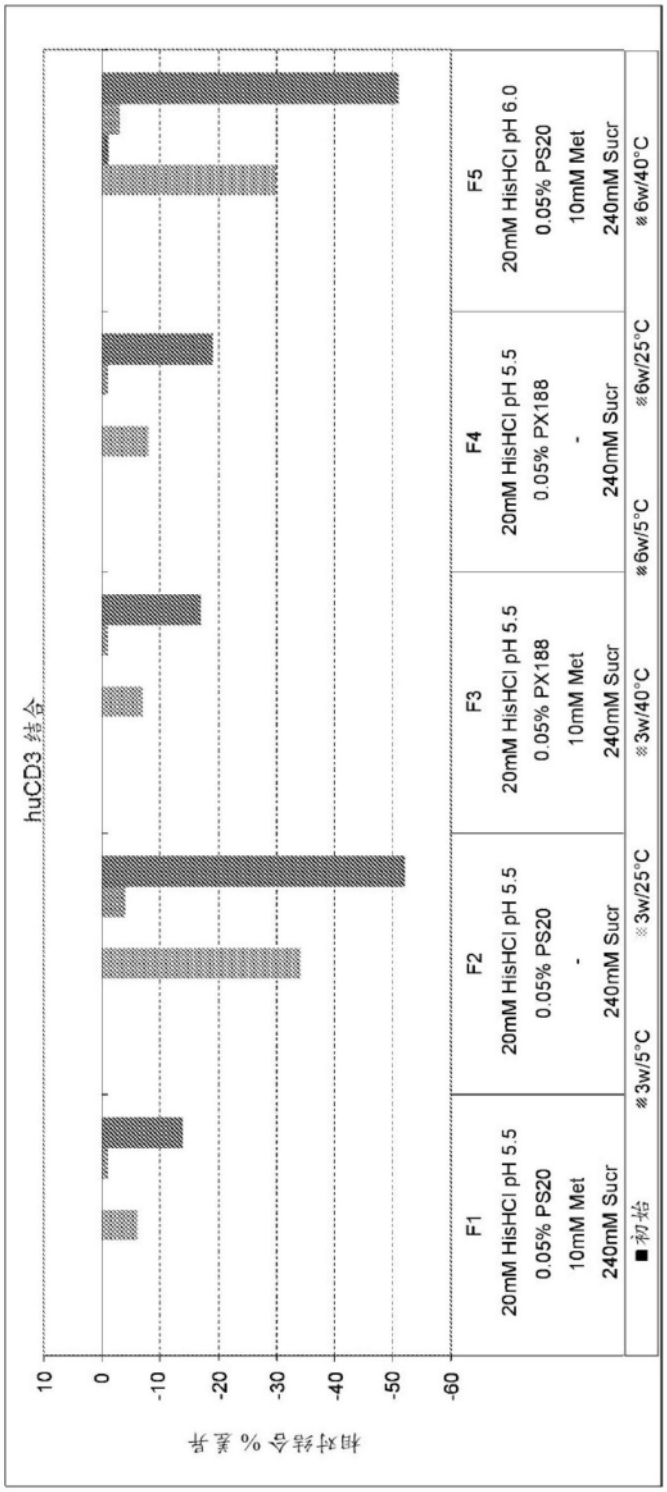

huCD3 结合
相对结合 % 差异
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
■初始
※3w/5°C
※3w/25°C
※3w/40°C
※6w/5°C
※6w/25°C
※6w/40°C

图18B

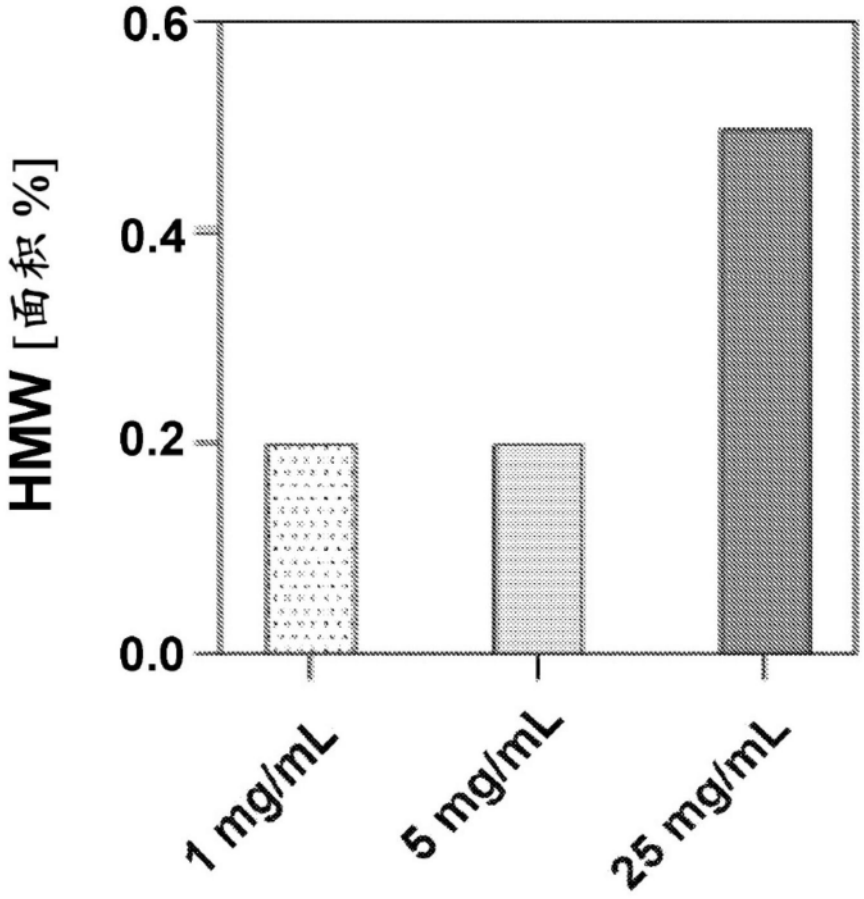


图19A

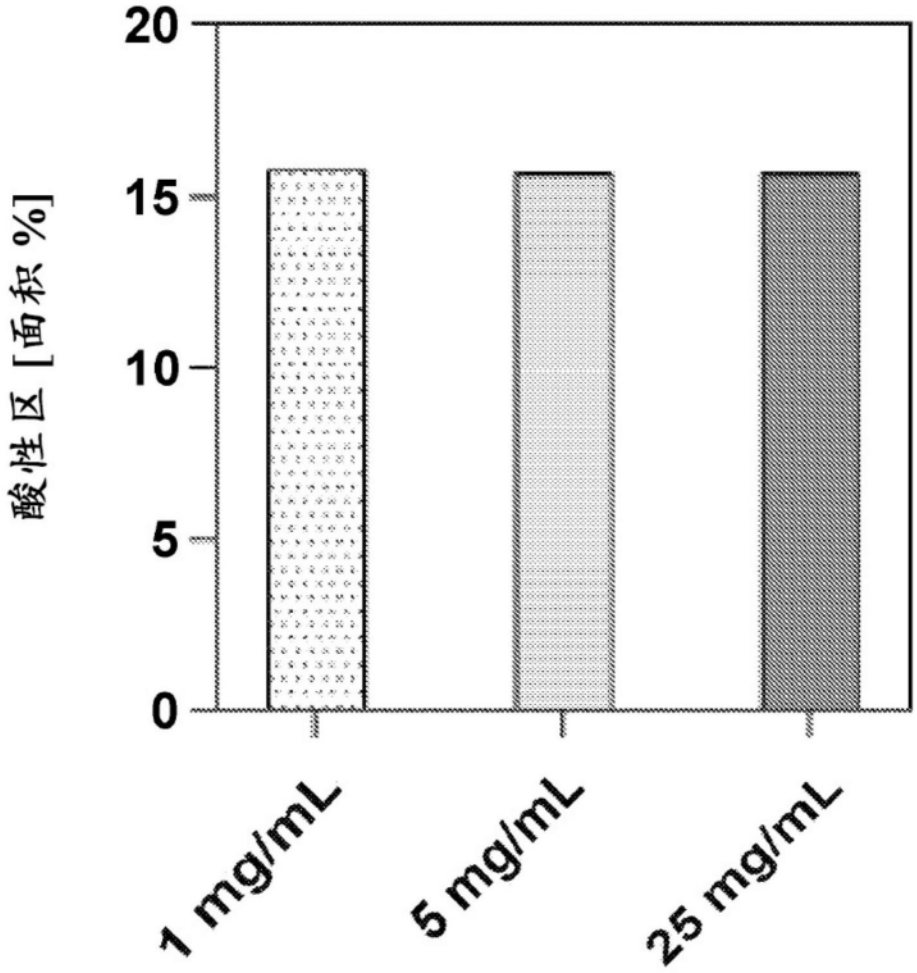


图19B

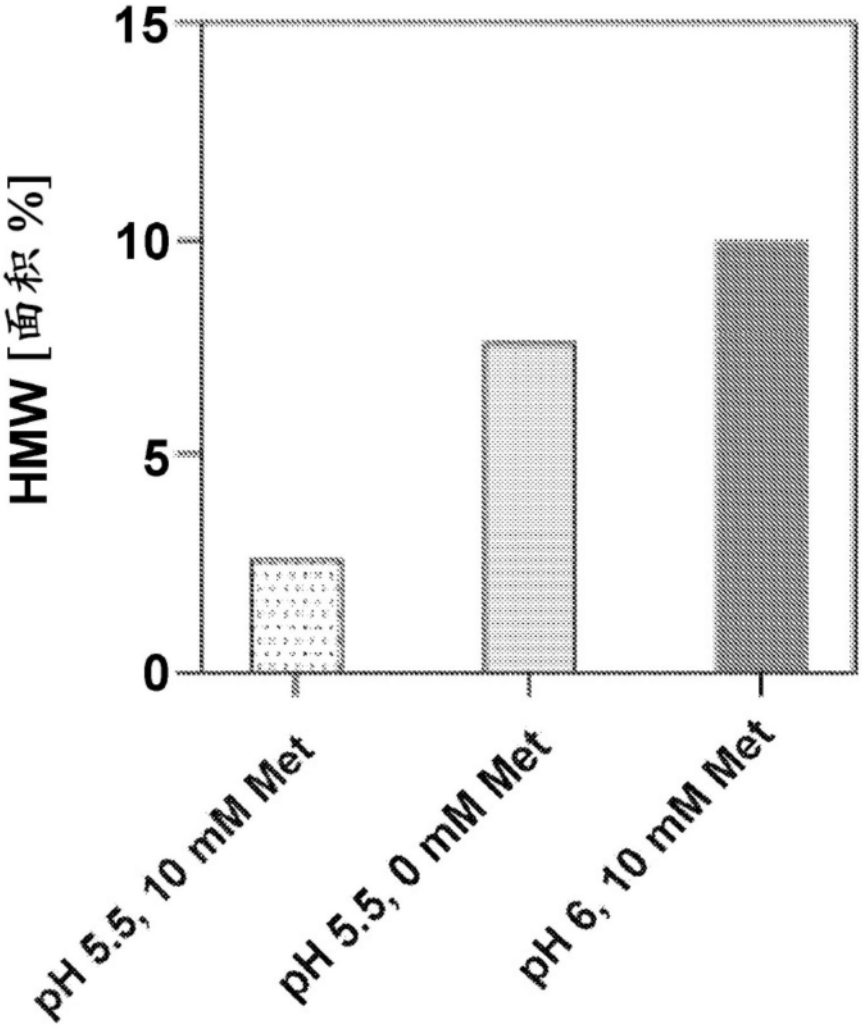


图20A

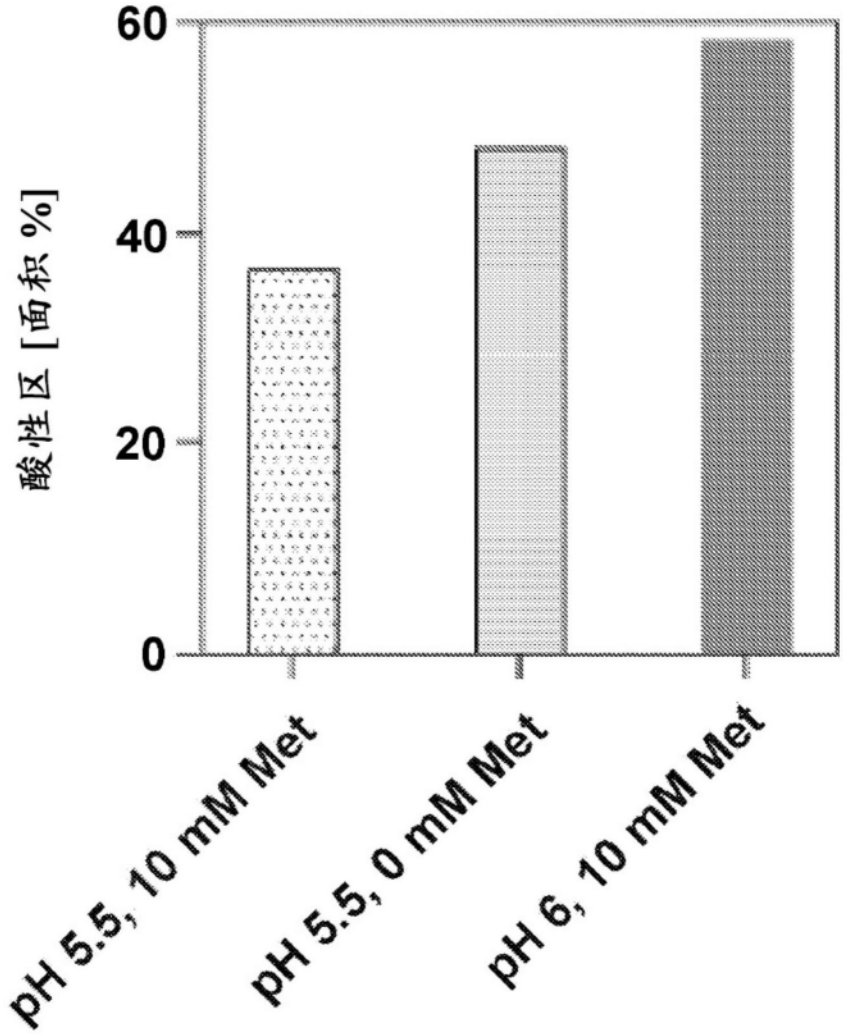
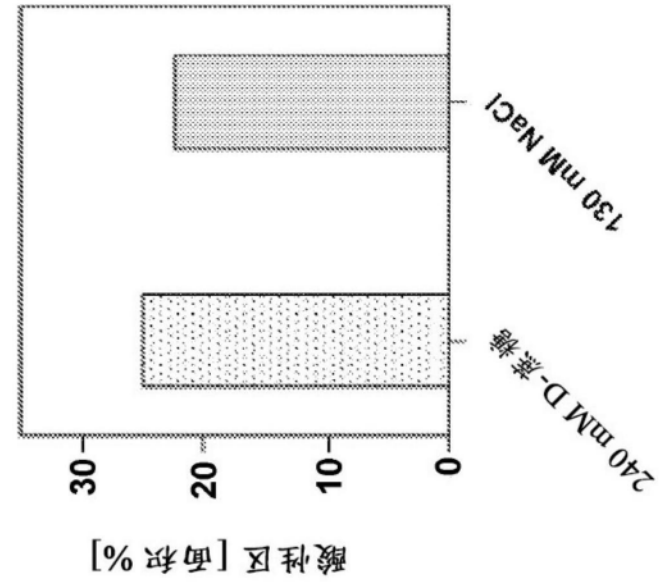
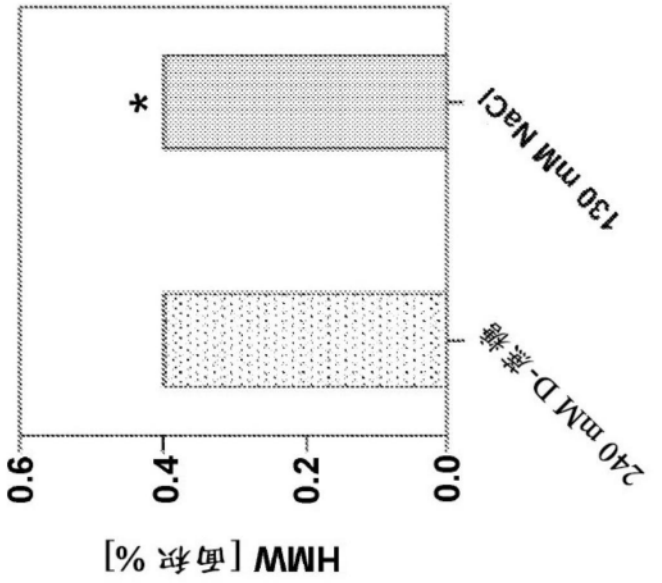


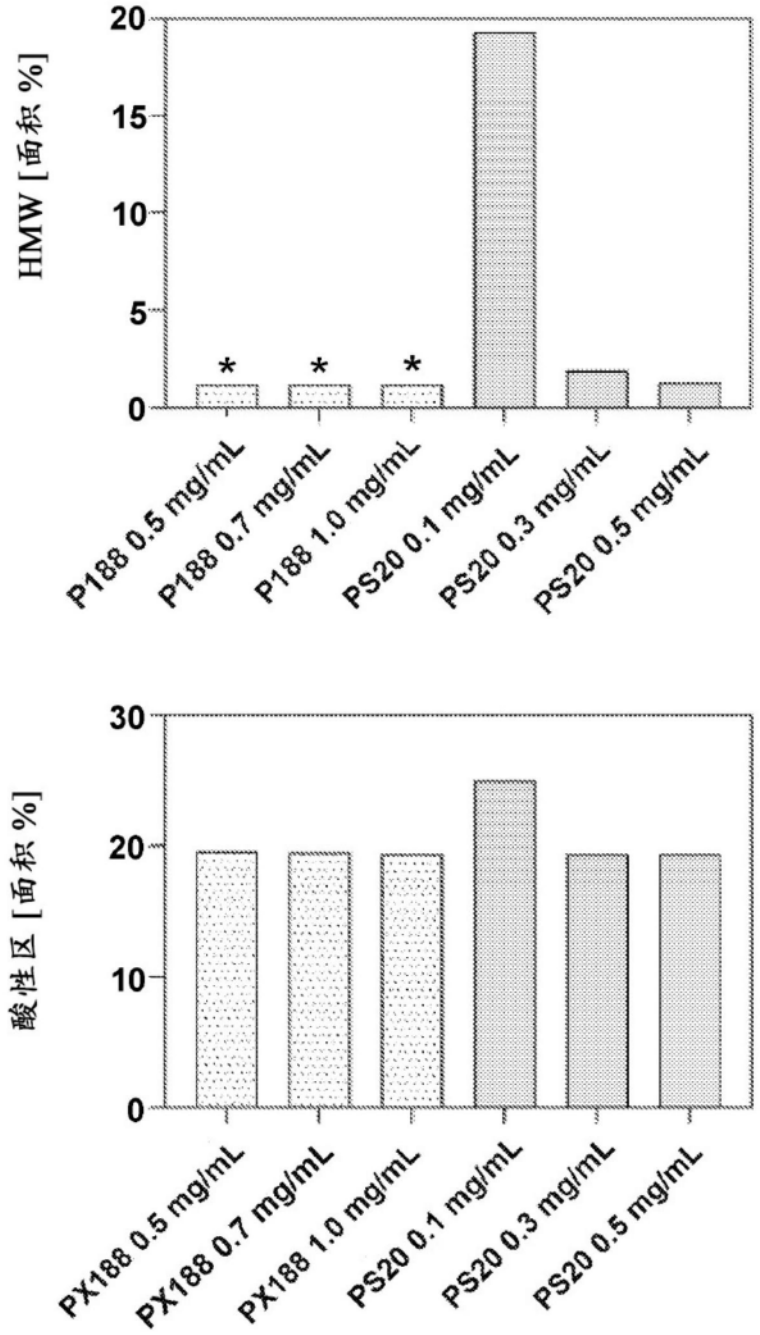
图20B


酸性区 [面积 %]
0
10
20
30
240 mM D-葡糖
130 mM NaCl


HMW [面积 %]
0.0
0.2
0.4
0.6
*
240 mM D-葡糖
130 mM NaCl

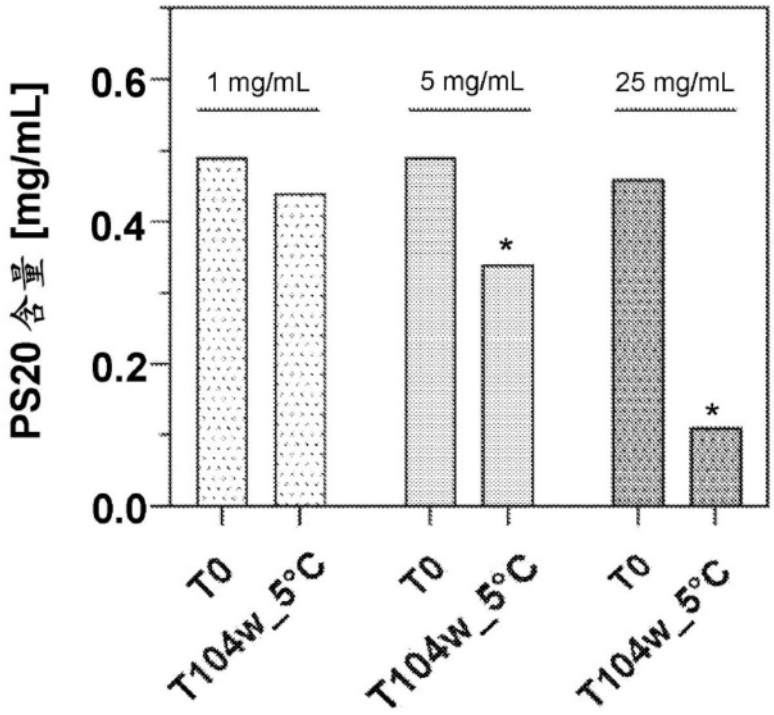
*含有可见颗粒

图21


HMW [面积 %]
20
15
10
5
0
*
*
*
P188 0.5 mg/mL
P188 0.7 mg/mL
P188 1.0 mg/mL
PS20 0.1 mg/mL
PS20 0.3 mg/mL
PS20 0.5 mg/mL
酸性区 [面积 %]
30
20
10
0
PX188 0.5 mg/mL
PX188 0.7 mg/mL
PX188 1.0 mg/mL
PS20 0.1 mg/mL
PS20 0.3 mg/mL
PS20 0.5 mg/mL

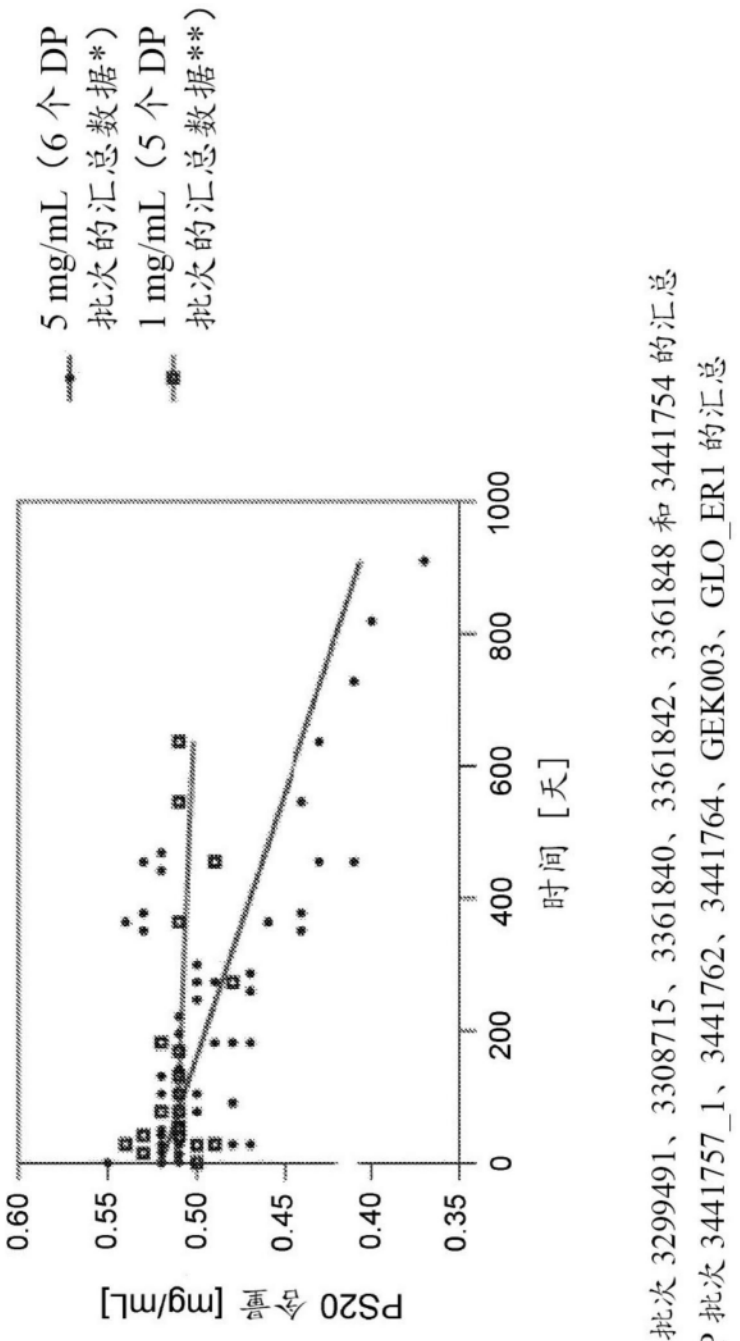
*含有可见颗粒

图22


PS20 含量 [mg/mL]
0.6
0.4
0.2
0.0
1 mg/mL
5 mg/mL
25 mg/mL
*
*
T0
T104w_5°C
T0
T104w_5°C
T0
T104w_5°C

*含有可见颗粒

图23



* DP 批次 3299491、3308715、3361840、3361842、3361848 和 3441754 的汇总

** DP 批次 3441757_1、3441762、3441764、GEK003、GLO_ER1 的汇总

图24