(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116194485 A
(43)申请公布日 2023.05.30

(21)申请号 202180052293.6
(22)申请日 2021.08.26
(30)优先权数据
63/070440 2020.08.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2021/057802 2021.08.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/043900 EN 2022.03.03
(71)申请人 詹森生物科技公司
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 J·库佩克 M·施莱尔
P·斯塔尔 S·托恩
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)

权利要求书3页 说明书44页
序列表11页

(54)发明名称

包含双特异性EGFR/C-MET抗体的稳定制剂

(57)摘要

本文提供了包含具有双特异性表皮生长因子受体(EGFR)/肝细胞生长因子受体(c-Met)抗体的制剂的稳定水性药物组合物及其制备方法。本文还提供了在对其有需要的受试者中通过向该受试者施用如本文所公开的稳定水性药物组合物来治疗癌症的方法。本文还提供了试剂盒和制品,其包含如本文所公开的稳定水性药物组合物。

CN 116194485 A

1.一种稳定水性药物组合物,包含:

a)约44mg/mL至约56mg/mL的双特异性表皮生长因子受体(EGFR)/肝细胞生长因子受体(c-Met)抗体,所述双特异性抗体包含:

包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1);

包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1);

包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2);和

包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2),

其中所述VH1分别包含SEQ ID NO:1、2和3的重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;所述VL1分别包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,所述VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的所述HCDR1、所述HCDR2和所述HCDR3氨基酸序列;并且所述VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3氨基酸序列;

b)约8mM至约12mM的组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐,

c)约6.8%(w/v)至约10.2%(w/v)的蔗糖,

d)约0.036%(w/v)至约0.084%(w/v)的聚山梨醇酯80(PS80),

e)约0.8mg/mL至约1.2mg/mL的甲硫氨酸,

f)约16μg/mL至约24μg/mL的乙二胺四乙酸(EDTA);和

g)pH为约5.2至约6.2。

2.根据权利要求1所述的稳定水性药物组合物,其中所述双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC1可变区和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC1可变区。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的稳定水性药物组合物,其中所述双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HC2可变区和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC2可变区。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述HC1包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,并且所述LC1包含SEQID NO:18的氨基酸序列。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述HC2包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,并且所述LC2包含SEQID NO:20的氨基酸序列。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述双特异性EGFR-cMet抗体为埃万妥单抗。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述双特异性EGFR-cMet抗体具有约50mg/mL的浓度。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐具有约10mM的浓度。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐包含L-组氨酸和L-组氨酸盐酸盐一水合物。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的稳定水性药物组合物,包含约8.5%(w/v)的蔗糖。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的稳定水性药物组合物,包含约0.06%(w/v)的

PS80。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述甲硫氨酸具有约1mg/mL的浓度。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述EDTA具有约20μg/mL的浓度。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述pH为约5.7。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的稳定水性药物组合物,包含50mg/mL双特异性EGFR-cMet抗体、10mM组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、8.5%(w/v)蔗糖、0.06%(w/v)PS80、1mg/mL甲硫氨酸和20μg/mL EDTA。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述稳定水性药物组合物在约2℃至8℃的温度下稳定至少两年。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中基于溶液颜色、pH、浊度、亚可见颗粒的数目、非糖基化重链(AGHC)的百分比、新峰的百分比、高分子量物质(HMWS)的百分比、低分子量物质(LMWS)的百分比、酸性峰的总和的百分比、碱性峰的总和的百分比、蛋白质浓度、EGFR结合活性的百分比、cMet结合活性的百分比、PS80的百分比或其任何组合来定义稳定性。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中所述组合物的总体积为约5mL至约10mL。

19.一种治疗需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括将根据权利要求1至18中任一项所述的药物组合物施用于所述受试者。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述施用为静脉内施用。

21.一种用于制备具有靶向EGFR和cMet的双特异性抗体的稳定水性药物组合物的方法,靶向EGFR和cMet的所述双特异性抗体包含:包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1);包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1);包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2);以及包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2),其中所述VH1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,它们分别包含SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列;所述VL1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,它们分别包含SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列;所述VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且所述VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列;所述方法包括:

将包含约50mg/mL的所述双特异性抗体、约10mM组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、约8.5%蔗糖和约1mg/mL L-甲硫氨酸的组合物与聚山梨醇酯80组合至约0.06%(w/v)的最终浓度以及与EDTA组合至约20μg/mL的最终浓度,其中所述稳定水性药物组合物的pH为约5.7。

22.根据权利要求21所述的方法,其中所述双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC1可变区和含有SEQ IDNO:14的氨基酸序列的LC1可变区。

23.根据权利要求21至22中任一项所述的方法,其中所述双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HC2可变区和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC2可变区。

24.根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:17

的氨基酸序列的重链1(HC1)和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链1(LC1)。

25.根据权利要求21至24中任一项所述的方法,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HC2和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LC2。

26.根据权利要求21至25中任一项所述的方法,其中所述抗体为埃万妥单抗。

27.一种试剂盒,包含根据权利要求1至18中任一项所述的稳定水性药物组合物及其使用说明书。

28.一种制品,包含容纳根据权利要求1至18中任一项所述的稳定水性药物组合物的容器。

29.根据权利要求28所述的制品,其中所述容器是具有能够被注射器刺穿的塞子的小瓶。

30.用于治疗癌症的根据权利要求1至18中任一项所述的药物组合物。

31.用于药物制备的根据权利要求1至18中任一项所述的药物组合物。

32.药物组合物用于通过施用根据权利要求1至18中任一项所述的药物组合物治疗需要的受试者中的癌症的用途。

33.根据权利要求32所述的药物组合物的用途,其中所述施用为静脉内施用。

包含双特异性EGFR/C-MET抗体的稳定制剂

[0001] 以电子方式提交的序列表参考

[0002] 本申请含有序列表,该序列表以电子方式经由EFS-Web作为ASCII格式化序列表提交,文件名为“JBI6337WOPCT1SEQLIST.txt”,创建日期为2021年7月26日,并且大小为19KB。经由EFS-Web提交的该序列表是本说明书的一部分并且全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明公开了组合物以及用于配制包含双特异性EGFR/c-Met抗体的稳定药物组合物的方法。

背景技术

[0004] 表皮生长因子受体(EGFR、ErbB1或HER1)和肝细胞生长因子受体(c-Met)二者在癌症中的作用已得到充分证实,使得这些靶点对联合治疗具有吸引力。两种受体通过相同的存活和抗凋亡途径(ERK和AKT)发信号。靶向EGFR和c-Met或双特异性抗EGFR/c-Met分子的联合治疗已在各种临床试验中得到测试。尽管双特异性抗EGFR/c-Met抗体已显示出有希望的结果,但本领域仍需要包含此类抗体的药物组合物,这些抗体在冷藏(2℃-8℃)和环境温度下长期稳定。

发明内容

[0005] 本文公开了稳定水性药物组合物,其包含具有双特异性抗体的特定制剂。

[0006] 在一个方面,本文提供了稳定水性药物组合物,其包含:

[0007] a)约44mg/mL至约56mg/mL的双特异性表皮生长因子受体(EGFR)/肝细胞生长因子受体(c-Met)抗体,该双特异性抗体包含:

[0008] 包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1);

[0009] 包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1);

[0010] 包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2);以及

[0011] 包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2),

[0012] 其中,VH1分别包含SEQ ID NO:1、2和3的重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;VL1分别包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列;

[0013] b)约8mM至约12mM的组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐,

[0014] c)约6.8%(w/v)至约10.2%(w/v)的蔗糖,

[0015] d)约0.036%(w/v)至约0.084%(w/v)的聚山梨醇酯80(PS80),

[0016] e)约至0.8mg/mL至约1.2mg/mL甲硫氨酸,

[0017] f)约16μg/mL至约24μg/mL的乙二胺四乙酸(EDTA);和

[0018] g)pH为约5.2至约6.2。

[0019] 本发明还提供了治疗需要的受试者的癌症的方法。这些方法包括向受试者施用如本文所公开的稳定水性药物组合物。

[0020] 此外，本文提供了用于制备具有靶向EGFR和cMet的双特异性抗体的稳定水性药物组合物的方法，该双特异性抗体包含：包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1)；包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1)；包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2)；以及包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2)，其中VH1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3，它们分别包含SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列；VL1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3，它们分别包含SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列；VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列；并且VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列。这些方法包括将包含约50mg/mL的双特异性抗体、约10mM组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、约8.5％蔗糖和约1mg/mL L-甲硫氨酸的组合物与聚山梨醇酯80组合至约0.06％(w/v)的最终浓度以及与EDTA组合至约20μg/mL的最终浓度，其中稳定水性药物组合物的pH为约5.7。

[0021] 此外，本发明还提供了试剂盒，其包含如本文所公开的稳定药物水性制剂及其使用说明书。

[0022] 本文还提供了制品，其包含容纳如本文所公开的稳定水性药物制剂的容器。

具体实施方式

[0023] 结合形成本公开一部分的附图，并参考以下具体实施方式，可更容易地理解所公开的组合物和方法。应当理解，所公开的组合物和方法不限于本文所描述和/或示出的特定组合物和方法，并且本文所用的术语仅用于以举例方式描述具体实施方案，并且不旨在限制受权利要求书保护的组合物和方法。

[0024] 除非另外特别说明，否则关于可能的机制或作用模式或改善原因的任何描述仅旨在出于示例性目的，并且所公开的组合物和方法不受任何此类建议的机制或作用模式或改善原因的正确或错误的约束。

[0025] 当本文列举或建立数值范围时，该范围包括其端值以及该范围内的所有单独整数和分数，并且也包括其中由那些端值以及内部整数和分数的所有各种可能组合形成的较窄范围中的每一者，以在相同程度上形成所述范围内的较大数值组的亚组，如同明确列举了那些较窄范围中的每一者一样。当在本文陈述数值范围大于规定值时，该范围然而是有限的，并且其上限由在如本文所述的本发明的上下文中可操作的值限定。当在本文陈述数值范围小于规定值时，该范围的下限然而由非零值限定。不旨在将本发明的范围限于当限定范围时所列举的特定值。所有范围均包括端值在内并且可组合。

[0026] 当前面使用“约”将值表示为近似值时，应当理解，该具体值构成了另一个实施方案。提及具体数值至少包括该具体值，除非上下文另有明确规定。

[0027] 应当理解，为清楚起见，所公开的组合物和方法的某些特征在各单独实施方案的上下文中进行阐述，但也可以组合形式在单个实施方案中提供。相反地，所公开的组合物和方法的各种特征为简明起见可在单个实施方案的上下文中进行阐述，也可分开地或以任何子组合形式进行提供。

[0028] 如本文所用，单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式。

[0029] 与说明书的各方面相关的各种术语在说明书和权利要求书中通篇使用。除非另外指明，否则此类术语被赋予本领域的普通含义。其他具体定义的术语应按照与本文所提供的定义相符的方式理解。

[0030] 如本文所用，当参考数值范围、截止值或特定值使用时，“约”用于指示所列举的值可与所列出的值相差多达10％。由于本文所用的许多数值是通过实验确定的，因此本领域的技术人员应当理解，此类确定可以在不同实验之间有差异并且通常在不同实验之间有差异。由于这种内在差异，认为本文所用的值不应受到过度限制。因此，术语“约”用于涵盖与指定值相差±10％或更小的变化、±5％或更小的变化、±1％或更小的变化、±0.5％或更小的变化、或者±0.1％或更小的变化。

[0031] 术语“包含”旨在包括由术语“基本上由……组成”和“由……组成”涵盖的示例；类似地，术语“基本上由……组成”旨在包括由术语“由……组成”所涵盖的示例。

[0032] 术语“抗体”及类似术语是广义的并且包括免疫球蛋白分子或其片段，其包括单克隆抗体(诸如鼠、人、人适应性、人源化和嵌合单克隆抗体)；抗体片段；双特异性或多特异性抗体；二聚体、四聚体或多聚体抗体；以及单链抗体。

[0033] 根据重链恒定结构域氨基酸序列，可将免疫球蛋白指定为五种主要种类，即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgA和IgG进一步细分为同种型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。基于其恒定域的氨基酸序列，可将任何脊椎物种的抗体轻链指定为两种完全不同的类型即κ和λ中的一种。

[0034] “抗体片段”是指免疫球蛋白分子的保留亲本全长抗体的抗原结合特性的部分。示例性的抗体片段为重链互补决定区(HCDR)1、2和3；轻链互补决定区(LCDR)1、2和3；重链可变区(VH)；或轻链可变区(VL)。抗体片段包括：Fab片段，其是由VL、VH、恒定轻链(CL)和(恒定重链1)CH1结构域组成的单价片段；$F(ab)_2$片段，其为包含通过铰链区处的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段；Fd片段，其由VH和CHI结构域组成；Fv片段，其由抗体的单臂的VL和VH结构域组成；以及结构域抗体(dAb)片段(Ward等人，Nature 341:544-546,1989)，其由VH结构域组成。VH和VL结构域可被工程化并经由合成接头连接在一起以形成各种类型的单链抗体设计，其中在VH和VL结构域由单独的单链抗体构建体表达的情况下，VH/VL结构域可在分子内或分子间配对，以形成单价抗原结合位点，诸如单链Fv(scFv)或双价抗体；例如在国际专利公布WO1998/44001、WO1988/01649、WO1994/13804和WO1992/01047中所描述。使用本领域的技术人员熟知的技术获得这些抗体片段，并筛选出效用方式与全长抗体相同的片段。

[0035] 抗体可变区由被三个“抗原结合位点”中断的“框架”区组成。使用不同术语来定义抗原结合位点：(i)三个在VH(HCDR1、HCDR2、HCDR3)中并且三个在VL(LCDR1、LCDR2、LCDR3)中的互补决定区(CDR)基于序列变异性(Wu和Kabat,J Exp Med 132:211-50,1970；Kabat等人Sequences of Proteins ofImmunological Interest，第5版，Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991)；以及(ii)三个在VH(H1、H2、H3)中并且三个在VL(L1、L2、L3)中的“高变区”(“HVR”或“HV”)是指抗体可变结构域的在结构上高变的区域，如Chothia和Lesk所定义(Chothia和Lesk,Mol Biol 196:901-17,1987)。其他术语包括“IMGT-CDR”(Lefranc等人,Dev Comparat Immunol 27:55-77,2003)和“特异性决定残基用途”(SDRU)(Almagro,Mol Recognit17:132-43,2004)。国际免疫遗传学(IMGT)数据

库(www_imgt_org)提供了抗原结合位点的标准化编号和定义。CDR、HV和IMGT描述之间的对应性在Lefranc等,Dev Comparat Immunol 27:55-77,2003中有所描述。

[0036] “单克隆抗体”是指单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力,或就双特异性单克隆抗体而言,显示出对于两种不同表位的双重结合特异性。因此,单克隆抗体是指在每条重链和每条轻链中具有单一氨基酸组成的抗体群,除了可能的熟知改变,诸如从抗体重链中除去C末端赖氨酸之外。单克隆抗体可在抗体群内具有异质糖基化。单克隆抗体可以是单特异性的或多特异性的,或者是单价的、二价的或多价的。术语“单克隆抗体”中包括双特异性抗体。

[0037] “表位”是指抗原的与抗体特异性结合的部分。表位通常由部分(诸如氨基酸或多糖侧链)的化学活性(诸如,极性、非极性或疏水性)表面基团构成,并且可具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。表位可由形成构象空间单元的连续和/或不连续氨基酸构成。对于不连续表位,来自抗原的线性序列的不同部分的氨基酸因蛋白质分子的折叠而在三维空间上靠近。

[0038] “变体”是指因一处或多处修饰(例如,置换、插入或缺失)而不同于参考多肽或参考多核苷酸的多肽或多核苷酸。

[0039] “与……联合使用”意指可将两种或更多种治疗剂以混合物一起、作为单一药剂同时或作为单一药剂以任何顺序依次施用给受试者。

[0040] “治疗”及类似的术语是指治疗性处理和预防性或预防措施,并且包括降低症状的严重性和/或频率、消除症状和/或症状的根本原因、降低症状的频率或可能性和/或其根本原因、改善或补救由恶性肿瘤直接或间接造成的损害。治疗也包括与未接受治疗的受试者的预期生存期相比延长生存期。要治疗的受试者包括患有病症或障碍的受试者以及易患病症或障碍的受试者或者要预防病症或障碍的受试者。

[0041] “治疗有效量”是指在所需剂量和时间段有效实现期望的治疗的本发明所公开的组合疗法的量。治疗有效量可根据以下因素而变化:诸如受试者的疾病状态、年龄、性别和体重,以及组合疗法在受试者中引发期望的缓解的能力。治疗有效量的示例性指标包括,例如:患者健康状况改善,肿瘤负荷减少,肿瘤生长被遏止或减慢,以及/或者癌细胞没有向身体其它部位转移。

[0042] 如本文所用,术语“癌症”定义为特征在于异常细胞快速且不受控制的生长的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散至身体的其他部位。各种癌症的示例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))等。

[0043] “受试者”包括任何人或非人动物。“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。术语“受试者”和“患者”在本文中可以互换使用。

[0044] 描述

[0045] 本文公开了包含双特异性EGFR/c-Met抗体的稳定水性药物组合物。

[0046] 在一些方面,稳定水性药物组合物包含双特异性EGFR/c-Met抗体,其包含:包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1);包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1);包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2);以及包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2),其中VH1分别

包含SEQ ID NO:1、2和3的重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;VL1分别包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3氨基酸序列;VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列(参见表14)。稳定水性药物组合物还包含组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、蔗糖、聚山梨醇酯80(PS80)、甲硫氨酸和乙二胺四乙酸(EDTA),并且pH为约5.2至约6.2。本文提供的稳定水性药物组合物还包含约44mg/mL至约56mg/mL的双特异性EGFR-cMet抗体、约8mM至约12mM的组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、约6.8%(w/v)至约10.2%(w/v)的蔗糖、约0.036%(w/v)至约0.084%(w/v)的聚山梨醇酯80(PS80)、约至0.8mg/mL至约1.2mg/mL的甲硫氨酸、约16μg/mL至约24μg/mL的EDTA;并且pH为约5.2至约6.2。

[0047] 在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第一重链(HC1)包含HC1恒定结构域3(HC1 CH3)和HC1可变区1(VH1)。在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第二重链(HC2)包含HC2恒定结构域3(HC2 CH3)和HC2可变区2(VH2)。在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第一重链(HC1)包含HC1恒定结构域3(HC1 CH3)和HC1可变区1(VH1)并且双特异性EGFR-cMet抗体的第二重链(HC2)包含HC2恒定结构域3(HC2 CH3)和HC2可变区2(VH2)。在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第一重链(HC1)包含HC1恒定结构域2和恒定结构域3(HC1 CH2-CH3)和HC1可变区1(VH1)。在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第二重链(HC2)包含HC2恒定结构域2和恒定结构域3(HC2 CH2-CH3)和HC2可变区2(VH2)。在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第一重链(HC1)包含HC1恒定结构域2和恒定结构域3(HC1 CH2-CH3)和HC1可变区1(VH1)并且双特异性EGFR-cMet抗体的第二重链(HC2)包含HC2恒定结构域2和恒定结构域3(HC2 CH2-CH3)和HC2可变区2(VH2)。

[0048] 在一些实施方案中,双特异性抗体在HC1 CH2-CH3区、HC2 CH2-CH3区或两者中包含非对称稳定突变。“非对称稳定突变”是指在第一CH2-CH3区中和在第二CH2-CH3区中的这样的突变:其处于第一CH2-CH3区中和第二CH2-CH3区中的不同位置处,并且相对于在第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区之间形成同源二聚体,有利于(例如使其稳定)在第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区之间形成异源二聚体。HC1 CH2-CH3区和HC2 CH2-CH3区中,或HC2 CH2-CH3区和HC1 CH2-CH3区中的示例性非对称稳定突变为(其中残基编号根据EU索引得出):

[0049] 分别为F405L和K409R;

[0050] 分别为野生型和F405L/R409K;

[0051] 分别为T366W和T366S/L368A/Y407V;

[0052] 分别为T366Y/F405A和T394W/Y407T;

[0053] 分别为T366W/F405W和T394S/Y407A;

[0054] 分别为F405W/Y407A和T366W/T394S;

[0055] 分别为L351Y/F405A/Y407V和T394W;

[0056] 分别为T366I/K392M/T394W和F405A/Y407V;

[0057] 分别为T366L/K392M/T394W和F405A/Y407V;

[0058] 分别为L351Y/Y407A和T366A/K409F;

[0059] 分别为L351Y/Y407A和T366V/K409F;

[0060] 分别为Y407A和T366A/K409F;

[0061] 分别为D399K/E356K和K409D/K392D;或者

[0062] 分别为D399K/E356K/E357K和K409D/K392D/K370。

[0063] 在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC1可变区和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC1可变区(参见表14)。在一些实施方案中,双特异性抗体在HC1 CH2-CH3区、HC2 CH2-CH3区或两者中包含非对称稳定突变。在一些实施方案中,双特异性抗体包含c-Met结合臂中的K409R和EGFR结合臂中的F405L。

[0064] 在一些方面,双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HC2可变区和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC2可变区(参见表14)。

[0065] 在一些实施方案中,重链1(HC1)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列并且HC2包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列(参见表14)。

[0066] 在一些实施方案中,轻链1(LC1)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列并且LC2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列(参见表14)。

[0067] 在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体为埃万妥单抗。

[0068] 根据一些方面,稳定水性药物组合物包含浓度为约以下的双特异性EGFR-cMet抗体:35mg/mL、36mg/mL、37mg/mL、38mg/mL、39mg/mL、40mg/mL、41mg/mL、42mg/mL、43mg/mL、44mg/mL、45mg/mL、46mg/mL、47mg/mL、48mg/mL、49mg/mL、50mg/mL、51mg/mL、52mg/mL、53mg/mL、54mg/mL、55mg/mL、56mg/mL、57mg/mL、58mg/mL、59mg/mL、60mg/mL、61mg/mL、62mg/mL、63mg/mL、64mg/mL或65mg/mL。在一些实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体具有约50mg/mL的浓度。

[0069] 根据一些方面,稳定水性药物组合物包含浓度为约以下的组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐:8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM或15mM。在一些实施方案中,组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐具有约10mM的浓度。在另外的实施方案中,组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐包括L-组氨酸和L-组氨酸盐酸盐一水合物。

[0070] 根据一些方面,稳定水性药物组合物包含浓度(重量与体积的百分比(%w/v))为约以下的蔗糖:6.0%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7.0%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8.0%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、9.9%、10.0%、10.1%、10.2%、10.3%、10.4%、10.5%、10.6%、10.7%、10.8%、10.9%或11.0%。在一些实施方案中,稳定水性药物组合物包含约8.5%(w/v)的蔗糖。

[0071] 根据一些方面,稳定水性药物组合物包含浓度(%w/v)为约以下的聚山梨醇酯80(PS80):0.036%、0.037%、0.038%、0.039%、0.040%、0.041%、0.042%、0.043%、0.044%、0.045%、0.046%、0.047%、0.048%、0.049%、0.050%、0.051%、0.052%、0.053%、0.054%、0.055%、0.056%、0.057%、0.058%、0.059%、0.060%、0.061%、0.062%、0.063%、0.064%、0.065%、0.066%、0.067%、0.068%、0.069%、0.070%、0.071%、0.072%、0.073%、0.074%、0.075%、0.080%、0.081%、0.082%、0.083%、0.084%、0.085%、0.086%、0.087%、0.088%、0.089%、0.090%、0.091%、0.092%、0.093%、0.094%或0.095%。在一些实施方案中,稳定水性药物组合物包含约0.06%(w/v)的PS80。

[0072] 根据一些方面,稳定水性药物组合物包含浓度为约以下的甲硫氨酸:0.1mg/mL、

0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL、1.3mg/mL、1.4mg/mL、1.5mg/mL、1.6mg/mL、1.7mg/mL、1.8mg/mL、1.9mg/mL或2.0mg/mL。在另一个实施方案中，甲硫氨酸具有约1.0mg/mL的浓度。

[0073] 根据一些方面，稳定水性药物组合物包含浓度为约以下的EDTA：10μg/mL、11μg/mL、12μg/mL、13μg/mL、14μg/mL、15μg/mL、16μg/mL、17μg/mL、18μg/mL、19μg/mL、20μg/mL、21μg/mL、22μg/mL、23μg/mL、24μg/mL、25μg/mL、26μg/mL、27μg/mL、28μg/mL、29μg/mL或30μg/mL。在一个实施方案中，EDTA具有约20μg/mL的浓度。

[0074] 储存时间

[0075] 在一些实施方案中，在储存指定的时间段后确定DP稳定性。在一些实施方案中，DP储存约3个月或更久、约6个月或更久、约12个月或更久、约1.5年或更久、约2年或更久、约2.5年或更久、约3年或更久、约3.5年或更久、约4年或更久、约4.5年或更久、约5年或更久、约6年或更久、约7年或更久、约8年或更久、约9年或更久或约10年或更久。在一些实施方案中，DP储存约12个月或更久、约1.5年或更久、约2年或更久、约2.5年或更久或约3年或更久。在一些实施方案中，DP储存约2年或更久。

[0076] 温度

[0077] 在一些实施方案中，DP在特定温度下储存特定时间段后是稳定的。在一些实施方案中，温度范围在约以下之间：-10℃至50℃、0℃至25℃、1℃至20℃、1℃至15℃、2℃至10℃或2至5℃。在一些实施方案中，温度范围在约2℃至8℃之间。在一些实施方案中，温度为约：-10℃、-9℃、-8℃、-7℃、-6℃、-5℃、-4℃、-3℃、-2℃、-1℃、0℃、1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃或50℃。

[0078] 在一些实施方案中，DP在储存约12个月或更久，或约2年或更久后以及在约2℃至约8℃范围内的温度下是稳定的。在一些实施方案中，DP在储存约12个月或更久，或约2年或更久后以及在约5℃的温度下是稳定的。在一些实施方案中，DP在储存约12个月或更久后以及在约25℃的温度下是稳定的。

[0079] 本发明所公开的水性药物组合物(也称为药物产品(DP))的稳定性是基于特定量或比例的双特异性EGFR-cMet抗体和如本文提供的DP的其他成分(诸如但不限于组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、蔗糖、PS80、甲硫氨酸和EDTA)以及各种因素的评估来确定的。这些因素包括但不限于溶液颜色、pH、浊度、亚可见颗粒的数目、非糖基化重链(AGHC)的百分比、新峰的百分比、高分子量物质(HMWS)的百分比、低分子量物质(LMWS)的百分比、酸性峰总和的百分比、碱性峰总和的百分比、蛋白质浓度、EGFR结合活性的百分比、cMet结合活性的百分比和/或PS80的百分比。

[0080] 如本文所公开的稳定DP不应被解释为需要本文列出的所有因素，而是需要这些因素中的至少一种、至少两种或至少三种或更多种。在一些实施方案中，所公开的稳定DP对于下文详细列出的因素中的至少一种、至少两种、至少三种或更多种表现出以下结果。在一些实施方案中，稳定DP对于下文详细列出的所有因素表现出以下结果。

[0081] 溶液颜色

[0082] 监测DP溶液颜色，并且可评估以验证该溶液的外观在放行时和在保质期内与先前

批次一致。DP溶液颜色可反映稳定性。在一个实施方案中,DP的稳定性定义为溶液颜色从无色至约BY2或更低、至约BY4或更低、至约B2或更低、至约B4或更低、至约Y2或更低或至约Y4或更低,如欧洲药典2.2.2,液体着色程度,欧洲药典(Ph.Eur.)第10版,专论编号20202,2019年7月中所述。

[0083] 在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,溶液颜色为无色至约BY2或更小、约B2或更小、约Y2或更小。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,溶液颜色为无色至约BY5或更小、至约B5或更小、至约Y5或更小。

[0084] pH

[0085] 测量DP溶液的pH使得能够确认其在放行时和在保质期内与先前的DP批次一致。在一个实施方案中,DP的稳定性定义为其pH为约:4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0。在一个实施方案中,DP在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后的pH为约5.7。在一个实施方案中,在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后pH的范围为约5.0至约6.4。在一个优选的实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其pH的范围为约5.2至约6.2。在一个最优选的实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其pH的范围为约5.4至约6.0。在一个最优选的实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其pH的范围为约5.3至约6.1。

[0086] 浊度

[0087] 浊度允许测量DP溶液中颗粒的存在,以确保在放行时和保质期内与先前的DP批次和适用的药典指南的一致性。在一个实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其浊度值为约:0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个散射浊度单位(NTU)。在一个实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其浊度值为约或小于18NTU。在一个优选的实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其浊度值为约或小于13NTU。在最优选的实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其浊度值为约或小于8NTU。在一个最优选的实施方案中,DP的稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后其

浊度值为大约或小于6NTU。

[0088] 颗粒分析

[0089] 基于亚可见颗粒的平均数目，将DP的稳定性设置为颗粒污染的特定阈值。在一个实施方案中，对于等于10μm或更大的粒度，存在于所测试的DP单元中的颗粒的平均数目不应超过每个容器100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000或6000个。在一个实施方案中，对于等于10μm或更大的粒度，存在于所测试的DP单元中的颗粒的平均数目不应超过每个容器6000个。在一个实施方案中，对于等于25μm或更大的粒度，存在于所测试的DP单元中的颗粒的平均数目不应超过每个容器100、200、300、400、500或600个。在一个实施方案中，对于等于25μm或更大的粒度，存在于所测试的DP单元中的颗粒的平均数目不应超过每个容器600个。

[0090] cSDS条件

[0091] 与基于凝胶的SDS-PAGE类似，还原毛细管SDS-PAGE(cSDS)是基于分子量分离变性蛋白质的方法。该方法允许定量DP纯度并监测其在放行时和在保质期内的稳定性。

[0092] 在一个实施方案中，在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，基于cSDS变量(例如纯度百分比、非糖基化重链(AGHC)或新峰的存在)的各种结果定义DP稳定性，其中cSDS在还原或非还原条件下进行。

[0093] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为具有约以下的百分比纯度:80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或为约或等于100％或其间的任何范围。

[0094] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为具有约以下的AGHC:0.1％、0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％或其间的任何范围。

[0095] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为当与未经处理的参考物质相比时，在cSDS结果中没有显示大于0.5％、0.8％、0.9％、1.0％、1.2％、1.3％、1.4％、1.5％、1.6％、1.7％、1.8％、1.9％或大于2％的新峰。

[0096] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为当与参考物质相比，具有约88％或更高的百分比纯度，约11％或更高的AGHC，并且没有大于1.5％的新峰。在一个优选的实施方案中，DP稳定性定义为与参考物质相比，具有约91％或更高的百分比纯度，具有约8％或更低的AGHC，并且没有大于1.0％的新峰。在一个最优选的实施方案中，DP稳定性定义为与参考物质相比，具有约94％或更高的百分比纯度，约5％或更低的AGHC，并且没有大于1.0％的新峰。在一个最优选的实施方案中，DP稳定性定义为与参考物质相比，具有约93％或更高的百分比纯度，约6％或更低的AGHC，并且没有大于1.0％的新峰。

[0097] 与基于凝胶的SDS-PAGE类似，非还原毛细管SDS-PAGE(cSDS)是基于分子量分离蛋白质的方法。该方法允许定量DP纯度并监测其在放行时和在保质期内的稳定性。

[0098] 在一个实施方案中，在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，基于cSDS变量(例如纯度百分比或新峰的存在)的各种结果定义DP稳定性，其中cSDS在非还原条件下进行。

[0099] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为具有约以下的百分比纯度:80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、

98%、99%或为约或等于100%或其间的任何范围。

[0100] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为当与未经处理的参考物质相比时,在cSDS结果中没有显示大于0.5%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%或大于2%的新峰。

[0101] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为当与参考物质相比,具有约90%或更高的百分比纯度,并且没有大于1.5%的新峰。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为与参考物质相比,具有约94%或更高的百分比纯度,并且没有大于1.2%的新峰。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为当与参考物质相比,具有约97%或更高的百分比纯度,并且没有大于1.0%的新峰。

[0102] 体积排阻HPLC(SE-HPLC)结果与稳定性一致

[0103] SE-HPLC程序允许评估DP的纯度并且监测其在非变性条件下在放行时和在保质期内的稳定性。

[0104] 在一个实施方案中,在约5℃的温度下DP储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,基于SE-HPLC变量(诸如主要组分(MC)、高分子量物质(HMWS)或低分子量物质(LMWS))的各种结果定义DP稳定性。

[0105] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约以下的MC:80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或等于约100%或其间的任何范围。在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约90%或更高的MC。在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约92%或更高的MC。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约95%或更高的MC。在最优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约97%或更高的MC。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约98%或更高的MC。

[0106] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约以下的HMWS:0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或其间的任何范围。在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约10%或更少的HMWS。在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约8%或更少的HMWS。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约5%或更少的HMWS。在最优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约至3%或更少的HMWS。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约2%或更少的HMWS。

[0107] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约以下的LMWS:0.1%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%或10%。在一个实施方案中,DP稳定性定义为具有约5%或更少的LMWS。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约2%或更少的LMWS。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为具有约1%或更少的LMWS。

[0108] 毛细管等电聚焦(cIEF)

[0109] 与等电凝胶电泳(IEF)方法类似,cIEF基于总电荷或等电点(pI)分离蛋白质。该程序允许监测药物产品在放行时和保质期内基于电荷的同种型的分布。在一个实施方案中,在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,基于cIEF变量(诸如主峰(MP)、酸性峰的总和或碱性峰的总和)的各种结果定义DP稳定性。

[0110] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有约以下的MP的cIEF:20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％或其间的任何范围。在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有在约30％至约90％范围内的MP的cIEF。在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有在约37％至约87％范围内的MP的cIEF。在一个优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有在约47％至约87％范围内的MP的cIEF。在一个优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有在约46％至约87％范围内的MP的cIEF。在最优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有在约57％至约87％范围内的MP的cIEF。在一个最优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有在约66％至约83％范围内的MP的cIEF。

[0111] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约以下的cIEF：1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或80％或其间的任何范围。在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约5％至约65％的cIEF。在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约10％至约60％的cIEF。在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约10％至约50％的cIEF。在一个优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约10％至约50％的cIEF。在一个优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约10％至约40％的cIEF。在一个最优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约10％至约40％的cIEF。在一个最优选的实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有酸性峰总和总计为约15％至约31％的cIEF。

[0112] 在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有碱性峰总和总计为约以下的cIEF：1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％或其间的任何范围。在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，具有碱性峰总和总计为约12％或更少的cIEF。在一个实施方案中，DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储

存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有碱性峰总和总计为约10%或更少的cIEF。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有碱性峰总和总计小于或为约10%的cIEF。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有碱性峰总和总计小于或为约8%的cIEF。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有碱性峰总和总计小于或为约8%的cIEF。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有碱性峰总和总计小于或为约5%的cIEF。

[0113] 蛋白质浓度

[0114] DP的蛋白质浓度使得能够验证其在放行时和在保质期内与先前的DP批次一致。可以通过测量药物产品溶液在280nm(A280)处的紫外光吸光度来完成蛋白质浓度的定量。

[0115] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有约以下的蛋白质浓度:10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、36mg/mL、37mg/mL、38mg/mL、39mg/mL、40mg/mL、41mg/mL、42mg/mL、43mg/mL、44mg/mL、45mg/mL、46mg/mL、47mg/mL、48mg/mL、49mg/mL、50mg/mL、51mg/mL、52mg/mL、53mg/mL、54mg/mL、55mg/mL、56mg/mL、57mg/mL、58mg/mL、59mg/mL、60mg/mL、61mg/mL、62mg/mL、63mg/mL、64mg/mL或65mg/mL。在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有约40mg/mL至约60mg/mL的蛋白质浓度。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有约45mg/mL至约55mg/mL的蛋白质浓度。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有约43mg/mL至约57mg/mL的蛋白质浓度。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有约47mg/mL至54mg/mL的蛋白质浓度。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,具有约45mg/mL至55mg/mL的蛋白质浓度。

[0116] 肽作图

[0117] 翻译后修饰(PTM),诸如氧化、脱酰胺和异构化,是可以在抗体结构中检测到的酶促修饰。在一些实施方案中,基于抗体中PTM的水平评估PD稳定性。酶促消化测试制品以产生肽片段。然后通过例如质谱(MS)、通过串联质谱(MS-MS)或超高性能液相色谱质谱(UPLC-MS)评价这些肽。每个所分析的肽序列都相对于其在整个抗体结构中的已知位置进行鉴定。通过将所鉴定的肽序列的测量质量与其预期质量进行比较来确定翻译后修饰。

[0118] 药物产品效力

[0119] DP与EGFR和/或c-Met的体外结合允许评估DP稳定性水平。可以通过使用但不限于均相竞争时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)测定来评估这种结合。

[0120] EGFR结合活性

[0121] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约5℃的温度下DP储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约以下的EGFR结合活性:20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%或其间的任何范围。在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约50%至约150%的EGFR结合活性。在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约60%至约140%的EGFR结合活性。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约60%至约140%的EGFR结合活性。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约65%至约130%的EGFR结合活性。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约80%至约120%的EGFR结合活性。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约70%至约130%的EGFR结合活性。

[0122] cMet结合活性结果与稳定性一致

[0123] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约以下的cMet结合活性:20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%或其间的任何范围。在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约50%至约150%的cMet结合活性。在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约60%至约140%的cMet结合活性。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约60%至约140%的cMet结合活性。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约65%至约125%的cMet结合活性。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约80%至约120%的cMet结合活性。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考,具有约76%至约125%的cMet结合活性。

[0124] 聚山梨醇酯80(PS80)

[0125] 在一个实施方案中,DP稳定性定义为在约5℃的温度下DP储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,PS80重量体积百分比浓度为约:0.005%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.08%、0.09%、0.1%、0.11%、0.12%、0.13%、0.14%或0.15%或其间的任何范围。在一

个实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,PS80浓度为约0.02%至约0.1%。在一个实施方案中,DP稳定性定义为PS80浓度为约0.03%至约0.09%。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,PS80浓度为约0.04%至约0.08%。在一个实施方案中,DP稳定性定义为PS80浓度为约0.02%至约0.09%。在一个优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,PS80浓度为约0.03%至约0.08%。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,PS80浓度为约0.05%至约0.08%。在一个最优选的实施方案中,DP稳定性定义为在约25℃的温度下DP储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,PS80浓度为约0.04%至约0.08%。

[0126] 在一个实施方案中,稳定水性药物组合物(或DP)的总体积范围为约5mL至约10mL。在一个实施方案中,稳定水性药物组合物(或DP)的总体积范围为约0.5mL至约20mL、约1mL至约15mL、约5mL至约10mL或约6mL至约8mL。在一个实施方案中,稳定水性药物组合物的总体积为约:0.5mL、0.6mL、0.7mL、0.8mL、0.9mL、1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL、16mL、18mL、19mL、20mL、25mL或30mL或其间的任何范围。

[0127] 方法

[0128] 本发明提供了一种治疗需要的受试者的癌症的方法。在一些实施方案中,癌症为肺癌。在一些实施方案中,肺癌为非小细胞肺癌(NSCLC)。该方法包括向受试者施用如本文所公开的稳定水性药物组合物。在一个实施方案中,该施用为静脉内施用。

[0129] 本文还提供了一种用于制备具有靶向EGFR和cMet的双特异性抗体的稳定水性药物组合物的方法。在该方法中使用的靶向EGFR和cMet的双特异性抗体包含:包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1);包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1);包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2);以及包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2),其中VH1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,它们分别包含SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列;VL1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,它们分别包含SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列;VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列(参见表14)。该方法还包括将包含约50mg/mL的双特异性抗体、约10mM组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、约8.5%蔗糖和约1mg/mL L-甲硫氨酸的组合物与聚山梨醇酯80组合至约0.06%(w/v)的最终浓度以及与EDTA组合至约20μg/mL的最终浓度,其中稳定水性药物组合物的pH为约5.7。

[0130] 在一个实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第一重链(HC1)包含HC1恒定结构域3(HC1 CH3)和HC1可变区1(VH1)。在另一个实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体的第二重链(HC2)包含HC2恒定结构域3(HC2 CH3)和HC2可变区2(VH2)。

[0131] 在一个实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC1可变区和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC1可变区(参见表14)。

[0132] 在一个实施方案中,双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HC2可变区和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC2可变区(参见表14)。

[0133] 在一个实施方案中,HC1包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列并且HC2包含SEQ ID NO:

19的氨基酸序列(参见表14)。

[0134] 在另一个实施方案中,LC1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列并且LC2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列(参见表14)。

[0135] 在一个实施方案中,该方法还包括过滤稳定水性药物组合物。在另一个实施方案中,用一个或多个0.22μm灭菌过滤器进行过滤。在一个实施方案中,灭菌过滤器的孔径为约:0.10μm、0.15μm、0.20μm、0.25μm、0.30μm、0.35μm、0.40μm、0.45μm、0.50μm、0.55μm、0.60μm、0.65μm、0.70μm或0.75μm。

[0136] 本文所公开的稳定水性药物组合物可包装到试剂盒、容器、包装、分配器或小瓶中。

[0137] 本文提供了一种试剂盒,其包含所公开的稳定水性药物及其使用说明书。

[0138] 本文还提供了一种制品,其包括容纳所公开的稳定水性药物组合物的容器。在一些实施方案中,容器是具有可被注射器刺穿的塞子的小瓶。

[0139] 示例性实施方案

[0140] 本文提供了所公开技术的说明性实施方案。这些实施方案仅是示例性的,并且不限制本公开或所附权利要求书的范围。

[0141] 实施方案1.一种稳定水性药物组合物,包含:

[0142] a)约44mg/mL至约56mg/mL的双特异性表皮生长因子受体(EGFR)/肝细胞生长因子受体(c-Met)抗体,该双特异性抗体包含:

[0143] 包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1);

[0144] 包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1);

[0145] 包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2);和

[0146] 包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2),

[0147] 其中,VH1分别包含SEQ ID NO:1、2和3的重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;VL1分别包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列;

[0148] b)约8mM至约12mM的组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐,

[0149] c)约6.8%(w/v)至约10.2%(w/v)的蔗糖,

[0150] d)约0.036%(w/v)至约0.084%(w/v)的聚山梨醇酯80(PS80),

[0151] e)约至0.8mg/mL至约1.2mg/mL甲硫氨酸,

[0152] f)约16μg/mL至约24μg/mL的乙二胺四乙酸(EDTA);和

[0153] g)pH为约5.2至约6.2。

[0154] 实施方案2.根据实施方案1所述的稳定水性药物组合物,其中该双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC1可变区和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC1可变区。

[0155] 实施方案3.根据实施方案1或实施方案2所述的稳定水性药物组合物,其中该双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HC2可变区和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC2可变区。

[0156] 实施方案4.根据实施方案1至3中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中HC1包

含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,并且LC1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0157] 实施方案5.根据实施方案1至4中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中HC2包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,并且LC2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0158] 实施方案6.根据实施方案1至5中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中该双特异性EGFR-cMet抗体为埃万妥单抗。

[0159] 实施方案7.根据实施方案1至6中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中该双特异性EGFR-cMet抗体具有约50mg/mL的浓度。

[0160] 实施方案8.根据实施方案1至7中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中该组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐具有约10mM的浓度。

[0161] 实施方案9.根据实施方案1至8中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中该组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐包含L-组氨酸和L-组氨酸盐酸盐一水合物。

[0162] 实施方案10.根据实施方案1至9中任一项所述的稳定水性药物组合物,其包含约8.5%(w/v)的蔗糖。

[0163] 实施方案11.根据实施方案1至10中任一项所述的稳定水性药物组合物,其包含约0.06%(w/v)的PS80。

[0164] 实施方案12.根据实施方案1至11中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中该甲硫氨酸具有约1mg/mL的浓度。

[0165] 实施方案13.根据实施方案1至12中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中EDTA具有约20μg/mL的浓度。

[0166] 实施方案14.根据实施方案1至13中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中pH为约5.7。

[0167] 实施方案15.根据实施方案1至14中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中基于溶液颜色、pH、浊度、亚可见颗粒的数目、非糖基化重链(AGHC)的百分比、新峰的百分比、高分子量物质(HMWS)的百分比、低分子量物质(LMWS)的百分比、酸性峰的总和的百分比、碱性峰的总和的百分比、蛋白质浓度、EGFR结合活性的百分比、cMet结合活性的百分比、PS80的百分比或其任何组合来定义稳定性。

[0168] 实施方案15a.根据实施方案1至14中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中基于溶液颜色、pH、浊度、亚可见颗粒的数目、非糖基化重链(AGHC)的百分比、由还原性cSDS测量的新峰的百分比、由非还原性cSDS测量的纯度和新峰的百分比、高分子量物质(HMWS)的百分比、低分子量物质(LMWS)的百分比、酸性峰的总和的百分比、碱性峰的总和的百分比、蛋白质浓度、EGFR结合活性的百分比、cMet结合活性的百分比、PS80的百分比或其任何组合来定义稳定性。

[0169] 实施方案15b.根据实施方案1至15中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中该稳定水性药物组合物在约2℃至8℃的温度下稳定至少两年。

[0170] 实施方案16.根据实施方案1至15中任一项所述的稳定水性药物组合物,其中该组合物的总体积为约5mL至约10mL。

[0171] 实施方案16a.根据实施方案1至14中任一项所述的稳定水性药物组合物,其包含50mg/mL的双特异性EGFR-cMet抗体、10mM的组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、8.5%(w/v)蔗糖、0.06%(w/v)PS80、1mg/mL甲硫氨酸和20μg/mL EDTA。

[0172] 实施方案17.一种治疗需要的受试者中的癌症的方法,该方法包括将根据实施方案1至16a中任一项所述的药物组合物施用于受试者。

[0173] 实施方案18.根据实施方案17所述的方法,其中该施用为静脉内施用。

[0174] 实施方案19.一种用于制备具有靶向EGFR和cMet的双特异性抗体的稳定水性药物组合物的方法,靶向EGFR和cMet的双特异性抗体包含:包含HC1可变区1(VH1)的第一重链(HC1);包含轻链可变区1(VL1)的第一轻链(LC1);包含HC2可变区2(VH2)的第二重链(HC2);以及包含轻链可变区2(VL2)的第二轻链(LC2),其中VH1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,它们分别包含SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列;VL1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,它们分别包含SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列;VH2分别包含SEQ ID NO:7、8和9的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且VL2分别包含SEQ ID NO:10、11和12的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列;所述方法包括:

[0175] 将包含约50mg/mL的双特异性抗体、约10mM组氨酸和/或药学上可接受的组氨酸盐、约8.5%蔗糖和约1mg/mL L-甲硫氨酸的组合物与聚山梨醇酯80组合至约0.06%(w/v)的最终浓度以及与EDTA组合至约20μg/mL的最终浓度,其中该稳定水性药物组合物的pH为约5.7。

[0176] 实施方案20.根据实施方案19所述的方法,其中该双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC1可变区和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC1可变区。

[0177] 实施方案21.根据实施方案19至21中任一项所述的方法,其中该双特异性EGFR-cMet抗体包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HC2可变区和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LC2可变区。

[0178] 实施方案22.根据实施方案19至21中任一项所述的方法,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的重链1(HC1)和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链1(LC1)。

[0179] 实施方案23.根据权利要求19至22中任一项所述的方法,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HC2和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LC2。

[0180] 实施方案24.根据实施方案19至23中任一项所述的方法,其中该抗体为埃万妥单抗。

[0181] 实施方案25.一种试剂盒,其包含根据实施方案1至16中任一项所述的稳定水性药物组合物及其使用说明书。

[0182] 实施方案26.一种制品,其包含容纳根据实施方案1至16中任一项所述的稳定水性药物组合物的容器。

[0183] 实施方案27.根据实施方案26所述的制品,其中该容器是具有可被注射器刺穿的塞子的小瓶。

[0184] 实施方案28.用于治疗癌症的根据实施方案1至16中任一项所述的药物组合物。

[0185] 实施方案29.用于药物制备的根据实施方案1至16中任一项所述的药物组合物。

[0186] 实施方案30.药物组合物用于通过施用根据实施方案1至16中任一项所述的药物组合物治疗需要的受试者中的癌症的用途。

[0187] 实施方案31.根据实施方案30所述的药物组合物的用途,其中该施用为静脉内施用。

[0188] 实施例

[0189] 提供以下实施例以进一步描述本文所公开的实施方案中的一些。这些实施例旨在说明而非限制本发明所公开的实施方案。

[0190] 本文中使用的分析测试的描述

[0191] 分析测试-一般表征

[0192] 溶液颜色

[0193] 监测药物产品的溶液颜色以评估外观并确保其在放行时和在保质期内与先前批次一致。溶液颜色可能是产品稳定性的指标。为了确定溶液颜色,将测试样品与限定的一组参比溶液进行视觉比较。

[0194] 将限定体积的液体内容物转移到与参比溶液相同尺寸的预先刻痕的安瓿中。然后将安瓿的内容物与欧洲药典颜色参比溶液进行视觉比较。在漫射日光下确定色度,在白色背景下观察。

[0195] 溶液颜色材料与方法

[0196] 材料与方法如欧洲药典2.2.2,液体着色程度,欧洲药典第10版,专论编号20202,2019年7月中所述。简而言之,将测试制品与B(棕色)、BY(棕黄色)和Y(黄色)颜色参比溶液组进行比较。

[0197] 溶液颜色结果与稳定性一致。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,溶液颜色为无色至约BY2或更小、约B2或更小、约Y2或更小。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,溶液颜色为无色至约BY4或更小、至约B4或更小、至约Y4或更小。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,溶液颜色为无色至约BY5或更小、至约B5或更小、至约Y5或更小。

[0198] pH

[0199] pH材料与方法-使用具有标准化pH电极的每日校准的电子pH计来测量测试制品的pH。在测试之前和期间,将所有校准溶液、参比缓冲液和测试制品平衡并保持在25℃。

[0200] pH结果与稳定性一致。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后pH范围为约5.0至约6.4。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后pH范围为约5.2至约6.2。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后pH范围为约5.4至约6.0。在一个最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后pH范围为约5.3至约6.1。

[0201] 浊度

[0202] 浊度材料与方法-材料与方法基于欧洲药典2.2.1,液体的透明度和乳光度。

[0203] 浊度结果与稳定性一致。测试结果以散射浊度单位(NTU)报告。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后浊度值为约18NTU或更小。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后浊度值为约13NTU或更小。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后浊度值为约8NTU或更小。在一个最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后浊度值为约6NTU或更小。

[0204] 分析试验-微粒物质

[0205] 微粒物质(亚可见)材料与方法-所有材料与方法均符合美国药典<788>微粒物质。使用配备有药典体积进样器装置的符合药典的液体颗粒计数器仪器。在测试之前,将测试制品平衡至室温至少60分钟,但不超过10小时。以符合美国药典<788>微粒物质的方式合并测试制品小瓶。根据美国药典<788>微粒物质的指导,取出四份合并的测试制品,每份具有适当的体积,并且计算每份中等于或大于10μm和25μm的颗粒数目。忽略第一部分获得的结果,其余三个结果用于计算所检查制剂的平均颗粒数目。

[0206] 符合颗粒分析(亚可见)药典的结果-测试结果符合美国药典<788>微粒物质、欧洲药典2.9.19和日本药典XVII/6.07微粒污染:亚可见颗粒。因此,对于粒径等于或大于10μm的颗粒,所测试单元中存在的颗粒平均数目不应超过每个容器6000个颗粒,并且对于粒径等于或大于25μm的颗粒,每个容器不应超过600个颗粒。

[0207] 分析测试-纯度

[0208] 还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(cSDS)

[0209] 还原cSDS材料与方法-分析采用商业毛细管电泳系统,其在温控盒中具有裸露的熔融石英毛细管,内径为50μm,长度为30.2cm;毛细管配备有对紫外光透明的检测窗。每次注射前对毛细管进行电动冲洗。在每次样品分析之前,用由缠绕的聚合物溶液组成的筛分基质装载毛细管。该方法利用SDS-MW凝胶迁移缓冲液和跨越约10kDa至148kDa范围的经过认证的蛋白分子量标准品。仪器的紫外吸收分光光度计检测器的波长设定为220nm,并且毛细管温度设定为25℃。为了降低样品处理条件,将测试制品(一式两份)与SDS和2-巯基乙醇混合,然后在限定的时间和温度下加热以使蛋白质完全变性和还原。通过穿过毛细管两端施加5kV的电压约20秒,以电动方式进样还原样品,然后通过施加更大的电场约35分钟进行分析。通过在光谱远紫外线区域220nm处的吸光度来完成检测。收集轻链、重链和非糖基化重链(AG HC)总信号数据百分比。

[0210] 还原cSDS结果与稳定性一致。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,与经过验证的埃万妥单抗参考物质储备液相比,纯度百分比≥88.0%,AG HC≤11.0%,并且没有>1.5%的新峰。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,与参考物质相比,纯度百分比为约或高于91.0%,

AG HC低于或为约8.0%，并且没有大于1.0%的新峰。在一个优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约或高于91.0%，AG HC低于或为约8.0%，并且没有大于1.2%的新峰。在最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约或高于94.0%，AG HC低于或为约5.0%，并且没有大于1.0%的新峰。在一个最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约或高于93.0%，AG HC低于或为约6.0%，并且没有大于1.0%的新峰。

[0211] 非还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(cSDS)

[0212] 非还原cSDS材料与方法-分析采用商业毛细管电泳系统，其在温控盒中具有裸露的熔融石英毛细管，内径为50μm，长度为30.2cm；毛细管配备有对紫外光透明的检测窗。每次注射前对毛细管进行电动冲洗。在每次样品分析之前，用由缠绕的聚合物溶液组成的筛分基质装载毛细管。该方法利用SDS-MW凝胶迁移缓冲液、跨越约10kDa至148kDa范围的经过认证的蛋白分子量标准品以及经过验证的埃万妥单抗参考物质样品。仪器的紫外吸收分光光度计检测器的波长设定为220nm，并且毛细管温度设定为25℃。对于非还原样品处理条件，将测试制品(一式两份)与SDS和烷化剂(N-乙基马来酰亚胺，以防止二硫键改组或重新形成)混合。然后在规定的时间和温度下加热，使蛋白质完全变性并最大程度地减少片段和人工制品条带的形成。通过穿过毛细管两端施加5kV的电压约20秒，以电动方式注入非还原样品，然后通过施加更大的电场约35分钟进行分析。通过在光谱远紫外线区域220nm处的吸光度来完成检测。收集总信号数据的百分比。还分析了数据与埃万妥单抗参考物质相比是否存在新峰。纯度百分比定义为重链百分比+轻链百分比。

[0213] 非还原cSDS结果与稳定性一致。在一个实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约88.0%或更高，并且没有大于1.5%的新峰。在一个实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约90.0%或更高，并且没有大于1.5%的新峰。在一个优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约90.0%或更高，并且没有大于1.0%的新峰。在一个优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约94.0%或更高，并且没有大于1.2%的新峰。在最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，与参考物质相比，纯度百分比为约94.0%或更高，并且没有大于1.0%的新峰。在一个最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或

更久后,与参考物质相比,纯度百分比为约97.0%或更高,并且没有大于1.0%的新峰。

[0214] 体积排阻高效液相色谱(SE-HPLC)

[0215] SE-HPLC材料与方法-将参考物质和测试制品稀释至目标蛋白质浓度。将20μL体积的分析物进样到7.8mm×30cm的体积排阻柱上,该柱具有5μm粒径的二氧化硅基质,分级范围为10kDa至500kDa。使用水性磷酸盐缓冲液作为流动相,流速为0.7mL/分钟,并且在280nm处连续监测洗脱液的吸光度。单体(主要组分或主峰)、聚集体(高分子量物质或HMWS)和片段(低分子量物质或LMWS)在色谱柱上分离并且在不同的保留时间洗脱。通过监测280nm处的峰吸光度来测量这些物质的量。

[0216] SE-HPLC结果与稳定性一致

[0217] 主要组分-在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约90.0%或更多的主要组分。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约92.0%或更多的主要组分。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约95.0%或更多的主要组分。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约97.0%的主要组分。在一个最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约98.0%的主要组分。高分子量物质(HMWS)-在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约10.0%或更少的HMWS。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约8.0%或更少的HMWS。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约5.0%或更少的HMWS。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约3.0%或更少的HMWS。在一个最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约2.0%或更少的HMWS。低分子量物质(LMWS)-在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约5.0%或更少的LMWS。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约2.0%或更少的LMWS。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有约1.0%或更少的LMWS。

[0218] 毛细管等电聚焦(cIEF)

[0219] cIEF材料与方法-分析程序在配备有自动进样器的市售成像cIEF分析仪上进行。该分析采用具有外壁聚酰亚胺涂层的100μm内壁涂层二氧化硅毛细管。另外,使用稀磷酸和甲基纤维素的分析物溶液、氢氧化钠和甲基纤维素的阴极电解液以及限定类型和量的两性电解质。用羧肽酶B(CPB)处理测试制品以除去C-端赖氨酸并且消除因每种带电物质存在多个C-端变体而引入的不确定性。将仪器的自动进样器设定为4℃,用于预聚焦和聚焦。预聚焦电压和时间分别为1500V和1分钟。聚焦电压和时间分别为3000V和7分钟。

[0220] cIEF结果与稳定性一致

[0221] 主峰-在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有37%-87%的主峰。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有47%-87%的主峰。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有46%-87%的主峰。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有57%-87%的主峰。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有66%-83%的主峰。

[0222] 酸性峰的总和-在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后酸性峰总和总计为10%-60%。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后酸性峰总和总计为10%-50%。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后酸性峰总和总计为10%-50%。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后酸性峰总和总计为10%-40%。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后酸性峰总和总计为10%-40%。在一个最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后酸性峰总和总计为15%-31%。

[0223] 碱性峰的总和-在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后碱性峰总和总计为约12.0%或更小。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后碱性峰总和总计为约10.0%或更小。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月

或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后碱性峰总和总计为约10.0%或更小。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后碱性峰总和总计为约8.0%或更小。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后碱性峰总和总计为约8.0%或更小。在一个最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后碱性峰总和总计为约5.0%或更小。

[0224] 分析测试-定量

[0225] 通过A280得到蛋白质浓度

[0226] 药物产品的蛋白质浓度通过定量280nm处的吸光度(A280)来确定。

[0227] 通过A280得到蛋白质浓度材料与方法

[0228] 使用合格并且经过校准的双光束紫外-可见分光光度计测量蛋白质浓度。使用0.9%(w/v)NaCl以1:125稀释测试制品。使用具有1cm光程和黑色或磨砂侧面的石英半微型比色皿(1.4mL)测量样品。将分光光度计设定为280nm的波长、1nm的狭缝宽度和一(1)秒的响应。使用0.9%(w/v)NaCl作为空白对照。通过将测试制品吸光度和稀释因子的乘积除以抗体的吸收率常数和仪器光程的乘积(例如,但不限于埃万妥单抗的吸收率常数为1.40(mg/mL)$^{-1}$cm^{-1}和仪器光程为1cm)来计算蛋白质浓度(mg/mL)。

[0229] 蛋白质浓度结果与稳定性一致

[0230] 在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有40mg/mL至60mg/mL的蛋白质浓度。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有45mg/mL至55mg/mL的蛋白质浓度。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有43mg/mL至57mg/mL的蛋白质浓度。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有47mg/mL至54mg/mL的蛋白质浓度。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后具有45mg/mL至55mg/mL的蛋白质浓度。

[0231] 分析测试-效力

[0232] 效力(表皮生长因子受体(EGFR)结合)

[0233] 使用均相竞争时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)测定形式证明药物产品与EGFR的体外结合。在该程序中,不同浓度的未标记双特异性EGFR-cMet抗体样品与供体荧光团(铕(Eu)螯合物)标记的双特异性EGFR-cMet抗体竞争以结合受体荧光团(Cy5)标记的EGFR抗原。供体荧光团的激发导致能量转移至结合的受体荧光团(FRET过程)。使用能够测量时间分辨荧光的酶标仪,通过在665nm处发射光来检测所得的FRET。将样品剂量响应曲线与RM进行比较。

[0234] EGFR结合材料与方法。经认证的商业EGFR(具有C-端His标签的重组人EGFR/ErbB1/HER1)与经认证的商业Cy5单NHS酯反应以生成Cy5标记的EGFR。经验证的双特异性EGFR-cMet抗体与经认证的商业铕(Eu)螯合物反应以生成Eu标记的双特异性EGFR-cMet抗体。在相同的测定板上平行测试双特异性EGFR-cMet抗体参考物质(RM)、测定对照和测试制品的系列稀释液。将Eu标记的双特异性EGFR-cMet抗体添加到每个RM、测定对照和测试制品中,然后轻轻摇动测定板。然后类似地添加Cy5-EGFR,再次轻轻摇动测定板,并且在暗处孵育4±1小时。然后通过分光光度法在665nm处测量荧光,针对抗体浓度作图并通过四参数逻辑模型进行分析。确定RM、测定对照和样品获得最大荧光响应的一半所需的抗体浓度(EC50)。基于样品(或对照)和RM EC50值的比率计算测定对照和样品的效力,并且报告为相对于RM的活性百分比。

[0235] EGFR结合活性结果与稳定性一致。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考物质,具有50%-150%的结合活性。在一个实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考物质,具有60%-140%的结合活性。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考物质,具有60%-140%的结合活性。在一个优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考物质,具有65%-130%的结合活性。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考物质,结合活性的范围介于约80%至120%之间。在最优选的实施方案中,稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后,在约25℃的温度下储存约12个月或更久后,和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后,相对于参考物质,结合活性的范围介于约70%至130%之间。

[0236] 效力(cMet结合)

[0237] 使用均相竞争时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)测定形式证明双特异性EGFR-cMet抗体与c-MET的体外结合。在该方法中,不同浓度的未标记双特异性EGFR-cMet抗体样品与供体荧光团(铕(Eu)螯合物)标记的双特异性EGFR-cMet抗体竞争以结合受体荧光团(Cy5)标记的c-MET抗原。供体荧光团的激发导致能量转移至结合的受体荧光团(FRET过程)。使用能够测量时间分辨荧光的酶标仪,通过在665nm处发射光来检测所得的FRET。将样品剂量响应曲线与参考物质(RM)进行比较。

[0238] c-MET结合材料与方法。经认证的商业cMet(具有c-端HIS标签的重组cMet/HGFR)与经认证的商业Cy5单NHS酯反应以生成Cy5标记的c-MET。经验证的双特异性EGFR-cMet抗体与经认证的商业铕(Eu)螯合物反应以生成Eu标记的双特异性EGFR-cMet抗体。在相同的测定板上平行测试双特异性EGFR-cMet抗体RM、测定对照和测试制品的系列稀释液。将Eu标记的双特异性EGFR-cMet抗体添加到每个RM、测定对照和测试制品中,然后轻轻摇动测定板。然后类似地添加Cy5-c-MET,再次轻轻摇动测定板,并且在暗处孵育4±1小时。然后通过

分光光度法在665nm处测量荧光，针对抗体浓度作图并通过四参数逻辑模型进行分析。确定RM、测定对照和样品获得最大荧光响应的一半所需的抗体浓度(EC50)。基于样品(或对照)和RM EC50值的比率计算测定对照和样品的效力，并且报告为相对于RM的活性百分比。

[0239] cMet结合活性结果与稳定性一致。在一个实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，相对于参考物质，结合活性的范围介于约50％至约150％之间。在一个实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，相对于参考物质，结合活性的范围介于约60％至约140％之间。在一个优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，相对于参考物质，结合活性的范围介于约60％至140％之间。在一个优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，相对于参考物质，结合活性的范围介于约65％至125％之间。在最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，相对于参考物质，结合活性的范围为约80％至约120％。在最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后，相对于参考物质，结合活性的范围为约75％至约125％。

[0240] 分析测试-表面活性剂

[0241] 聚山梨醇酯-80定量

[0242] 通过混合模式离子交换/疏水HPLC定量确定聚山梨醇酯80。

[0243] PS80材料与方法。使用配备2.1×20mm在线柱的梯度HPLC进行分析，该柱包含30μm可用水润湿的混合模式聚合球形吸附剂颗粒、ELSD和30℃的温控柱隔室。流速设定为1mL/分钟，并且ELSD蒸发器温度设定为50℃。流动相A是2％v/v甲酸的水溶液，流动相B是2％v/v甲酸的异丙醇溶液。纯聚山梨醇酯80用于产生校准和校验标准品。纯测试制品样品进样。

[0244] 聚山梨醇酯80结果与稳定性一致。在一个实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后PS80浓度为0.03％-0.08％。在一个实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后PS80浓度为0.02％-0.09％。在一个优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后PS80浓度为0.04％-0.08％。在一个优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后PS80浓度为0.03％-0.08％。在最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后PS80浓度为0.05％-0.08％。在一个最优选的实施方案中，稳定性定义为在约5℃的温度下储存约12个月或更久后，在约25℃的温度下储存约12个月或更久后，和/或在约5℃的

温度下储存约2年或更久后PS80浓度为0.04%-0.08%。

[0245] 分析测试-常规表征

[0246] 肽作图

[0247] 此测试的目的是测量抗体结构中可能存在的翻译后修饰水平，诸如氧化、脱酰胺和异构化。酶促消化测试制品以产生肽片段。然后通过超高性能液相色谱质谱(UPLC-MS)对这些肽进行评价。每个所分析的肽序列都相对于其在整个抗体结构中的已知位置进行鉴定。通过将所鉴定的肽序列的测量质量与其预期质量进行比较来确定翻译后修饰。

[0248] 肽作图材料与方法。用6M胍、50mM Tris pH8.0、5mM EDTA使样品变性，并且使用30kDa离心过滤装置过滤(丢弃流过物)。用1M二硫苏糖醇(DTT)还原变性的样品，之后用1M碘乙酸钠烷基化，并且用DTT进一步处理以淬灭反应。通过Sephadex G-25柱将反应混合物交换到消化缓冲液(50mM Tris pH7.0，含1mM $CaCl_2$)中，其中单独的柱用于空白、参考物质和测试制品。将1mg/mL胰蛋白酶储备溶液的等分试样添加到消化缓冲液中的样品中，产生20μL/mL胰蛋白酶浓度。将溶液在37℃下孵育2小时±30分钟。将经胰蛋白酶消化的溶液冷却至室温，并且用三氟乙酸使酶失活。通过配备Waters Acquity BEH(乙烯桥杂化)C18、2.1×100mm、1.7μm、130Å柱和所连接的自动进样器的超高性能液相色谱质谱(UPLC-MS)评价经处理的样品。流动相A是0.1%甲酸的水溶液，流动相B是0.1% FA的乙腈溶液(流动相B)。自动进样器设定为2℃-8℃，柱设定为40℃，并且流速设定为500μL/分钟。对洗脱的肽进行电喷雾电离，并且使用校准的在线质谱进行检测。

[0249] 实施例1:高通量(HTP)多因素筛选研究

[0250] 进行高通量(HTP)多因素筛选研究以选择制剂缓冲液、赋形剂、聚山梨醇酯和pH的组合。这是通过生成由缓冲剂、赋形剂、聚山梨醇酯和pH值的各种组合组成的多种测试制剂来实现的。然后对测试制剂进行人工加压并分析蛋白质不稳定的替代标记。

[0251] 在这些研究中，将大约200μL的每种测试制剂在65℃下保持24小时，然后使其被动恢复至环境室温。然后对温度平衡的样品进行分光光度分析以确定测试制剂在350nm处的吸光度。在350nm处增加的吸光度是广泛接受的蛋白质不稳定和聚集的替代相关属性。因此，具有相对较低吸光度值的热应力测试制剂被认为是“稳定的”制剂，其增加的测量吸光度值与相对降低的稳定性相关。测试制剂的组成及其在350nm处测量的吸光度显示在下表1中。所有测试制剂的缓冲液浓度为20mM。就上下文而言，空孔(空白)在350nm处的典型吸光度值为0.104个吸收单位(AU)。

[0252] 表1:测试制剂的组成及其在350nm处测量的吸光度

[0253]

缓冲液	pH	表面活性剂	赋形剂	350nm 处的吸收单位
磷酸盐	7.0	0.04%（w/v）聚山梨醇酯 20	8%蔗糖	1.286
			5%山梨醇	1.331
			8%海藻糖	1.324
		0.04%（w/v）聚山梨醇酯 80	8%蔗糖	1.352
			5%山梨醇	1.383
			8%海藻糖	1.357
组氨酸	6.5	0.04%（w/v）聚山梨醇酯 20	8%蔗糖	0.222
			5%山梨醇	0.260
			8%海藻糖	0.245
		0.04%（w/v）聚山梨醇酯 80	8%蔗糖	0.234
			5%山梨醇	0.278
			8%海藻糖	0.280
	6	0.04%（w/v）聚山梨醇酯 20	8%蔗糖	0.165
			5%山梨醇	0.180
			8%海藻糖	0.181
		0.04%（w/v）聚山梨醇酯 80	8%蔗糖	0.168
			5%山梨醇	0.195
			8%海藻糖	0.178
	5.5	0.04%（w/v）聚山梨醇酯 20	8%蔗糖	0.135
			5%山梨醇	0.138
			8%海藻糖	0.137
		0.04%（w/v）聚山梨醇酯 80	8%蔗糖	0.131
			5%山梨醇	0.131
			8%海藻糖	0.131
乙酸盐	5.5	0.04%（w/v）聚山梨醇酯 20	8%蔗糖	0.179
			5%山梨醇	0.188
			8%海藻糖	0.201
		0.04%（w/v）聚山梨醇酯 80	8%蔗糖	0.195
			5%山梨醇	0.207
			8%海藻糖	0.208
	5	0.04%（w/v）聚山梨醇酯 20	8%蔗糖	0.141
			5%山梨醇	0.146

[0254]

				8%海藻糖	0.138
			0.04%（w/v）聚山梨醇酯80	8%蔗糖	0.145
				5%山梨醇	0.149
				8%海藻糖	0.133
		4.5	0.04%（w/v）聚山梨醇酯20	8%蔗糖	0.143
				5%山梨醇	0.150
				8%海藻糖	0.143
			0.04%（w/v）聚山梨醇酯80	8%蔗糖	0.151
				5%山梨醇	0.160
				8%海藻糖	0.130
	柠檬酸盐	4.5	0.04%（w/v）聚山梨醇酯20	8%蔗糖	0.515
				5%山梨醇	0.596
				8%海藻糖	0.632
			0.04%（w/v）聚山梨醇酯80	8%蔗糖	0.673
				5%山梨醇	0.779
				8%海藻糖	0.838

[0255] 吸光度结果主要由pH以非线性方式驱动，最低的吸光度值见于pH5.5，最高的吸光度值见于pH4.5和pH7.0。然而，缓冲液的化学性质似乎也起到了作用。在相同的pH5.5时，组氨酸显示出比乙酸盐低的值。考虑到乙酸盐(4.76)和组氨酸(6.04)的pKa，组氨酸在pH5.5时比乙酸盐具有更强的缓冲能力。更强的能力解释了在相同pH值时组氨酸相对于乙酸盐的较低吸光度值。这也可以解释在pH4.5时柠檬酸盐(pKa 3.09)和乙酸盐(4.76)之间的结果差异。相反，磷酸盐(pKa 6.82)在pH7.0时应具有较强的缓冲能力。然而，磷酸盐吸光度值比研究中观察到的大多数值高5-10倍，因此可以断然排除作为潜在缓冲系统的可能性。以类似的方式，在pH4.5时的柠檬酸盐吸光度值比研究中观察到的大多数值高2-5倍。用接近其pKa的柠檬酸盐进行配制需要的pH值对于制药应用来说是不切实际的，因此也可以断然排除作为潜在缓冲系统的可能性。

[0256] 通过将研究作为产生16个研究组的8个缓冲液/pH值组合组中的2个聚山梨醇酯物质组进行检查，可以观察到赋形剂种类对吸光度值的一致但轻微的影响。从这个角度来看，在16个组中的13个组中，相对于山梨糖醇和海藻糖，蔗糖显示出最低的吸光度值。因此，尽管山梨糖醇和海藻糖可以证明是可接受的赋形剂，但蔗糖可以被认为是优选的赋形剂。

[0257] 在整个研究过程中，聚山梨醇酯20通常显示出比相应的聚山梨醇酯80值更低的吸收值。就上下文而言，表面活性剂在单克隆抗体制剂(诸如聚山梨醇酯)中的主要作用是保护抗体免受机械(振动)应力，而不是此HTP筛选研究中使用的热应力。从这个角度来看，在两种聚山梨醇酯之间观察到的吸收值的差异可以被认为是可忽略的。然而，应注意，在该研究中观察到的最低吸光度值含有聚山梨醇酯80。

[0258] 实施例2:聚山梨醇酯浓度范围摇动和冻融研究

[0259] 进行此研究以确定聚山梨醇酯80的浓度范围，该浓度范围可稳定埃万妥单抗免受机械、界面和冷冻/解冻应力的影响。该研究还评价了聚山梨醇酯80在5℃储存12个月后的保护性能。

[0260] 创建了六组相同的测试制剂小瓶。每组包含一个小瓶，每个小瓶含有低(0.03%)、目标(0.06%)和高(0.08%)聚山梨醇酯80浓度(%w/v)的测试制剂。所有其他制剂组分保

持恒定(50mg/mL埃万妥单抗、10mM组氨酸、8.5％蔗糖、1mg/mL甲硫氨酸、20μg/mL乙二胺四乙酸(EDTA)，pH5.7)。将制剂分配到8R小瓶中至7.5mL的填充体积，加塞、加盖和卷边密封。

[0261] 为了建立一般研究基线数据，在研究开始时测试一组小瓶以用作未经处理的时间零对照(T＝0)。

[0262] 为评价聚山梨醇酯80对机械和界面应力的稳定作用，将一组小瓶水平放置在定轨摇动器上，并在环境室温和光照条件下(T72h摇动)以250rpm摇动72小时。在相同的72小时周期期间，将第二组对应的未摇动对照小瓶垂直保持在环境室内和光照条件下(T72h对照)。

[0263] 为评价老化的聚山梨醇酯80对机械和界面应力的稳定作用，将两组小瓶在5℃下保持12个月。使用上述方法，将一组摇动72小时(T12m T72h摇动)，另一组作为对照保持(T12m T72h对照)。

[0264] 为评价聚山梨醇酯80对冷冻/解冻应力的稳定作用，使一组小瓶经历五(5)个冷冻/解冻循环(5xFT)，其中一个循环定义为冷冻至-70℃，之后在环境室温下被动解冻。

[0265] 如以下结果所示，与T＝0和未摇动对照样品相比，摇动应力后没有观察到属性值的显著差异。在摇动应力之前在5℃下保持12个月的样品观察到类似的结果。此外，与T＝0对照相比，在冷冻/解冻应力后未观察到属性值的显著差异。在摇动应力和冷冻/解冻应力下，低、目标和高聚山梨醇酯80样品之间的属性值没有显著差异。这表明，用0.03％(w/v)至0.08％(w/v)范围内的聚山梨醇酯80配制的稳定埃万妥单抗可保护免受机械、界面和冷冻/解冻的影响。

[0266] 表2.摇动和冷冻/解冻研究的结果。

[0267] 表2.摇动和冷冻/解冻研究的结果

[0268]

测试条件	测试制剂（％（w/v）PS 80）	颜色	pH	浊度	微粒物质（亚可见）		A280	SE-HPLC		
				NTU	≥10μm 颗粒/小瓶	≥25μm 颗粒/小瓶	mg/mL	主要组分%	HMWS%	LMWS%
T=0	0.03	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.2	88	30	50.0	98.8	1.1	0.0
	0.06	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.5	37	13	50.2	98.8	1.1	0.0
	0.08	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.6	38	10	50.1	98.8	1.1	0.1
T72h 摇动	0.03	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.5	125	12	50.3	98.8	1.1	0.1
	0.06	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.8	70	8	50.9	98.9	1.1	0.1
	0.08	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.7	4.6	87	23	50.4	98.8	1.1	0.1
T72h 对照	0.03	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.4	57	20	50.1	98.8	1.1	0.1
	0.06	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.3	42	3	50.0	98.8	1.1	0.1
	0.08	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.5	55	17	50.0	98.8	1.1	0.1
T12m T72h 摇动	0.03	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.9	4.7	167	23	49.9	98.6	1.2	0.2
	0.06	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.9	4.7	65	0	50.3	98.7	1.2	0.2
	0.08	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.6	80	18	50.5	98.6	1.2	0.2
T12m T72h 对照	0.03	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.5	95	12	50.3	98.7	1.2	0.2
	0.06	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	6.4	30	3	50.3	98.7	1.2	0.2
	0.08	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	6.5	35	5	50.2	98.6	1.2	0.2
5X F/T	0.06	≤B9，≤BY7，≤Y7	5.8	4.7	112	7	50.4	98.8	1.1	0.0

[0269] 表3.摇动和冷冻/解冻研究的结果

[0270]

测试条件	测试制剂（%（w/v）PS80）	cSDS（还原）			cSDS（非还原）		cIEF			PS80	EGFR	cMET
		纯度%	AGHC%	没有>1.0%的新峰	纯度%	没有>1.0%的新峰	主峰%	酸性峰的总和%	碱性峰的总和%	（%）	结合%	结合%
T0	0.03	95.4	3.9	NNP	98.4	NNP	74.4	23.4	2.3	0.027	106	93
	0.06	95.4	3.9	NNP	98.4	NNP	74.7	22.3	2.9	0.055	102	94
	0.08	95.4	3.9	NNP	98.3	NNP	75.3	22.3	2.4	0.076	109	100
T72h摇动	0.03	95.1	4.0	NNP	98.5	NNP	74.1	23.3	2.7	0.027	94	104
	0.06	95.3	3.9	NNP	98.5	NNP	73.5	23.7	2.9	0.053	110	99
	0.08	95.3	3.9	NNP	98.5	NNP	73.6	23.4	2.9	0.074	104	98
T72h对照	0.03	95.3	3.9	NNP	98.5	NNP	73.9	23.3	2.9	0.027	93	99
	0.06	95.3	3.9	NNP	98.5	NNP	73.3	23.8	2.9	0.052	104	100
	0.08	95.3	3.9	NNP	98.5	NNP	74.7	22.9	2.5	0.074	107	99

[0271]

T12m	0.03	95.2	4.0	NNP	98.0	NNP	74.2	23.0	2.9	0.031	92	102
T72h摇动	0.06	95.2	4.0	NNP	97.9	NNP	74.5	22.6	3.0	0.051	98	96
	0.08	95.2	4.0	NNP	98.0	NNP	74.4	22.9	2.6	0.076	90	83
T12m	0.03	95.2	4.0	NNP	98.1	NNP	74.1	22.8	3.2	0.031	88	103
T72h对照	0.06	95.2	4.0	NNP	98.0	NNP	74.1	22.8	3.1	0.051	102	98
	0.08	95.2	4.0	NNP	98.1	NNP	74.5	22.7	2.9	0.078	103	81
5xFT	0.06	95.2	4.0	NNP	98.5	NNP	74.5	22.7	2.9	0.054	101	104

[0272] 实施例3:金属尖峰研究

[0273] 进行此研究以评价在双特异性EGFR-cMet抗体的制造期间潜在存在或引入的金属离子和过氧化物的影响。这被设计为评估在一组过大的应力条件下的制剂稳定性和补充制剂赋形剂在减少或防止氧化途径方面的功效。

[0274] 测试制剂由补充有或不补充1mg/mL L-甲硫氨酸和20μg/mL EDTA的50mg/mL埃万妥单抗、10mM组氨酸、8.5%(w/v)蔗糖、0.06%(w/v)PS80(pH5.7)组成。通过用氧化性金属(例如氧化性金属包括但不限于铁(Fe3+)、铬(Cr3+)、铜(Cu2+)、镍(Ni2+)和钼(Mo5+))和/或溶解的过氧化氢尖峰测试制剂来产生过大的应力条件。金属的选择基于可能存在于制造过程中的金属合金组分的组成。选择过氧化氢是由于在其用于无菌制造空间的净化之后潜在存在残余材料。所评价的金属和过氧化氢的浓度是在商业GMP药物产品制造方法中观察到的最高值的两倍。测试制剂的汇总列于下表4中。

[0275] 表4:测试制剂和应激物的组成

[0276]

制剂ID编号编号	描述	测试制剂的组成	金属尖峰	过氧化氢尖峰
I	无补充剂（阴性对照）	10mM组氨酸、8.5%蔗糖、0.06% PS80	否	否
II	无补充剂+金属	10mM组氨酸、8.5%蔗糖、0.06% PS80	是	否
III	无补充剂+过氧化物	10mM组氨酸、8.5%蔗糖、0.06% PS80	否	是
IV	EDTA/+甲硫氨酸（阳性对照）	10mM组氨酸、8.5%蔗糖、0.06% PS80、20μg/mL EDTA、1mg/mL甲硫氨酸	否	否
V	EDTA+甲硫氨酸+金属+过氧化物	10mM组氨酸、8.5%蔗糖、0.06% PS80、20μg/mL EDTA、1mg/mL甲硫氨酸	是	是

[0277] 将测试制剂以7.5mL的填充体积等分到8R小瓶中。将小瓶加塞、加盖和卷边密封。在推荐(5℃)、加速(25℃)和应力(40℃)储存条件下稳定放置小瓶。在指定的时间点,抽取样品并通过肽作图测定氧化。

[0278] 研究结果

[0279] 在6个月推荐(5℃)储存条件下,与未补充的制剂(I)相比,暴露于金属(II)或过氧化氢(III)的未补充制剂显示出轻微至轻度增加的氧化。这表明,在推荐的储存条件下,金属和过氧化物的过大水平似乎会在未补充制剂(I)中引起轻微至轻度的氧化。然而,在相同的6个月5℃稳定性条件下,在甲硫氨酸/EDTA补充制剂(IV)和暴露于金属和过氧化氢的相同补充制剂(V)之间观察到的氧化值不存在有意义的差异。此外,补充制剂(IV)显示出比暴露于金属(II)或过氧化氢(III)的未补充制剂更低的氧化值。这表明,补充有EDTA和甲硫氨酸的制剂能够减轻在推荐的储存条件下因过大水平的金属和过氧化物而引起的氧化。

[0280] 在一个月应力(40℃)和六个月加速(25℃)储存条件下观察到相同的趋势,但具有更显著的水平。与未补充的制剂(I)相比,暴露于金属(II)或过氧化氢(III)的未补充制剂清楚地显示出增加的氧化。然而,在甲硫氨酸/EDTA补充制剂(IV)和暴露于金属和过氧化氢的相同补充制剂(V)之间观察到的氧化值不存在有意义的差异。此外,补充制剂(IV)清楚地显示出比暴露于金属(II)或过氧化氢(III)的未补充制剂更低的氧化值。这证明了EDTA和甲硫氨酸补充制剂在加速和应力储存条件下减轻因过大水平的金属和过氧化物而引起的氧化的稳健性。

[0281] 总之,此数据显示,补充有甲硫氨酸和EDTA的制剂在金属和过氧化物介导的氧化的稳健还原中是成功的。

[0282] 实施例4:制剂稳健性的发展

[0283] 研究设计

[0284] 进行此研究以检查保持在推荐(5℃)和加速(25℃)条件下的双特异性EGFR-cMet抗体药物产品的制剂组分浓度水平的多因素变化的影响。所评价的制剂组分为蛋白质浓度、组氨酸浓度、蔗糖浓度、聚山梨醇酯80浓度、EDTA/甲硫氨酸浓度和pH。所测试的因子浓度范围列于表5中。

[0285] 表5.所测试的因子浓度范围

[0286]

测试因子	低	靶标	高
双特异性 EGFR-cMet 抗体（埃万妥单抗）蛋白质浓度（mg/mL）	44	50	56
pH	5.2	5.7	6.2
组氨酸浓度（mM）	8	10	12
蔗糖浓度（%w/v）	6.8	8.5	10.2
血清浓度（μg/mL）	16	20	24
甲硫氨酸浓度（mg/mL）	0.8	1	1.2
PS80 浓度（% w/v）	0.036	0.06	0.084

[0287] 基于此标准,使用JMP®统计软件创建具有中心点的部分因子设计(表6)。

[0288] 表6.测试制剂的组成

[0289]

测试制剂	蛋白质（mg/mL）	pH	组氨酸（mM）	蔗糖（%w/v）	EDTA（μg/mL）	甲硫氨酸（mg/mL）	PS80（%w/v）
1	44	5.2	8	6.8	16	0.8	0.036
2	44	6.2	8	10.2	24	1.2	0.036
3	50	5.7	10	8.5	20	1	0.06
4	44	6.2	12	10.2	16	0.8	0.036
5	56	6.2	8	10.2	16	0.8	0.084
6	50	5.7	10	8.5	20	1	0.06
7	56	5.2	12	6.8	24	1.2	0.084
8	56	6.2	12	6.8	24	1.2	0.036
9	56	5.2	8	10.2	16	0.8	0.036
10	44	5.2	12	10.2	24	1.2	0.084
11	44	6.2	8	6.8	16	0.8	0.084

[0290] 制备测试制剂并且以7.5mL的填充体积等分到8R小瓶中。将小瓶加塞、加盖和卷边密封。在推荐(5℃)和加速(25℃)条件下稳定放置小瓶。在指定的时间点，抽取样品并进行测定。

[0291] 研究结果

[0292] 11种制剂在研究开始时(时间零)、在推荐储存条件(5℃)下12个月后以及在加速温度(25℃)下6个月后的每个属性的测试结果在表7中示出。数据报告为11种制剂的每个属性的范围、平均值和标准偏差。

[0293] 在5℃下保持12个月的所有制剂的分析结果表明测定测试值几乎没有变化，表明是稳定的。具有多变量范围赋形剂浓度的所有制剂产生窄范围的测定测试结果值的能力证明了制剂在所测试的边界和储存条件内的稳健性。此外，在此研究中每次测定观察到的值的全部范围与在2℃-8℃保持时稳定性的最优选的实施方案一致。

[0294] 在加速(25℃)储存条件下保持6个月的所有制剂的分析结果显示降解效果与暴露于延长的加速储存条件下的双特异性EGFR-cMet抗体的稳定性特征一致。然而，对于大多数结果，与5℃下12个月观察到的结果相比，影响的幅度相对较小。类似地，结果值范围的增加幅度也相对较小，只有不到一半的范围等于或小于在5℃下12个月所观察到的那些。这表明，即使在加速储存条件下，赋形剂浓度的多变量范围也会产生相对一致的结果。

[0295] 表7A：双特异性EGFR-cMet抗体制剂在25℃下保持6个月和在5℃下保持12个月的稳定性数据(范围、平均值和标准偏差)

[0296]

测定		时间和储存条件								
		T=0M			6M 25℃			12M 5℃		
		范围	平均值	SD	范围	平均值	SD	范围	平均值	SD
cIEF	主峰面积%	73.9 - 75.2	74.5	0.4	55.1 - 58.2	56.3	1.1	72.5 - 74.7	73.8	0.7
	酸性峰的总和%	22 - 23.4	22.7	0.4	37.8 - 40.4	39.1	0.8	22.8 - 24.9	23.7	0.8
	碱性峰的总和%	2.4 - 3.4	2.8	0.2	3.9 - 5.5	4.7	0.5	2.1 - 3.0	2.5	0.3
cSDS	%纯度（非还原）	97.6 - 98.4	98.1	0.3	95.7 - 96.5	96.1	0.3	97.8 - 98.2	98.1	0.1
	%纯度（还原）	95 - 95.1	95.1	0.1	93 - 98.3	93.2	0.1	94.8 - 95.1	95.0	0.1
SE-HPLC	聚集体%	0.8 - 1.0	0.9	0.1	0.8 - 1.4	1.1	0.2	0.81 - 1.4	1.1	0.2
	单体%	98.9 - 91.1	99.0	0.1	98 - 98.6	98.3	0.2	98.5 - 99	98.8	0.2
	片段%	0.1 - 0.1	0.1	0.0	0.5 - 0.7	0.6	0.1	0.14 - 0.16	0.2	0.0
微粒物质（亚可见）[a]	颗粒/容器≥10μm	25 - 215	69.9	59.2	27 - 97	64.9	19.5	13 - 165	68.0	41.5
	颗粒/容器≥25μm	5 - 44	15.5	11.3	5 - 8	11.7	4.6	0 - 25	10.6	8.3
浊度	NTU	3.5 - 5.1	4.1	0.5	3.6 - 5.1	4.4	0.5	3.5 - 4.9	4.1	0.5

[0297] [a]较高标准偏差最可能是由于在这些低水平的微粒物质下的测定可变性

[0298] 实施例5:配制药物批量生产

[0299] 方法描述

[0300] 处理溶液

[0301] 表7B.处理溶液目标组成和范围

[0302]

溶液	组成和范围
渗滤缓冲液	10mM 组氨酸，8.5%蔗糖，1mg/mL L-甲硫氨酸，pH5.6±0.3
聚山梨醇酯 80，EDTA 储备溶液	10mM 组氨酸、8.5%蔗糖、1mg/mL L-甲硫氨酸、6.0%（w/v）聚山梨醇酯 80、2mg/mL EDTA，pH5.6±0.3

[0303] 超滤/渗滤(UF/DF)

[0304] 执行超滤/渗滤(UF/DF)以将埃万妥单抗病毒截留滤液中间体制造溶液重新配制为预配制的本体(pFB)溶液，该溶液由50mg/mL埃万妥单抗、10mM组氨酸、8.5％蔗糖、1mg/mL L-甲硫氨酸，pH5.7组成。

[0305] 埃万妥单抗配制本体(FB)的制备

[0306] 将聚山梨醇酯80(6.0％w/v)和EDTA(2mg/mL)储备溶液以1:100稀释添加到pFB中以获得0.06％(w/v)聚山梨醇酯80和20μg/mL EDTA的最终浓度，从而产生由50mg/mL埃万妥单抗、10mM组氨酸、8.5％(w/v)蔗糖、1mg/mL L-甲硫氨酸、0.06％聚山梨醇酯80、20μg/mL EDTA，pH5.7组成的配制本体(FB)。然后将FB溶液均匀混合。使用无菌0.45μm/0.22μm过滤器，紧接着随后使用在线0.22μm过滤器来实现对配制本体进行最终过滤。

[0307] 最终本体填充

[0308] 在最终过滤之后，将FB填充到聚碳酸酯生物容器中。填充体积为生物容器规定体积的20％至90％。

[0309] 最终本体储存和运输

[0310] 药物产品生产前配制本体的储存和运输条件为:如果FB储存约一周或更短时间，则在5℃±3℃避光，如果FB储存超过一周，则在-40℃±10℃避光。

[0311] 实施例6:药物制剂:初级包装的组成和组分

[0312] 本文提供了埃万妥单抗药物产品制剂的组成的表格汇总(表8)。

[0313] 表8.埃万妥单抗药物产品的组成

[0314]

组分	组合物	每 mL 的量
埃万妥单抗	50mg	50mg
L-组氨酸	10mM	0.413mg
L-组氨酸盐酸盐一水合物		1.538mg
蔗糖	8.5%（w/v）	85mg
聚山梨醇酯 80	0.06%	0.60mg
L-甲硫氨酸	1.0mg/mL	1.0mg
EDTA 二钠盐二水合物	20μg/mL	0.02mg
注射用水	适量至 1.0mL	适量至 1.0mL

[0315] 埃万妥单抗药物产品(DP)初级包装由玻璃小瓶、聚合物小瓶塞子和铝密封件组成。表9列出了初级包装材料的特定组分。

[0316] 表9.初级包装材料部件

[0317]

部件	描述
玻璃小瓶	8mL 玻璃 1 型硼硅酸盐
塞子	20mm 丁基橡胶，FluroTec 涂层塞子
密封件	带翻转按钮的 20mm 铝密封件

[0318] 实施例7:稳定性研究的描述

[0319] 进行此研究以监测埃万妥单抗药物产品在各种环境条件和时间长度下的稳定性属性。通过将配制本体以7.5mL的填充体积等分到8R小瓶中来制备研究测试制品。将小瓶加塞、加盖和卷边密封

[0320] 所有研究都是在小瓶处于倒置取向的情况下进行的。

[0321] 表10:研究参数

[0322]

稳定性分类	储存条件	持续时间（月）
实时	5±3℃	36
加速	25±2℃/60% RH	12
加压	40±2℃/75% RH	6

[0323] 稳定性研究结果

[0324] 埃万妥单抗DP保持在推荐、加速和应力条件下的稳定性结果如下所示。在推荐的存储条件下保持的DP的所有时间点,每个测定研究观察到的所有测试参数结果值符合或超过与在约5℃的温度下储存约12个月或更久后或在约5℃的温度下储存约24个月或更久后保持时的稳定性的最优选的实施方案一致的标准。在加速条件(25℃)下保持12个月的DP显示结果符合或超过在约25℃的温度下储存约12个月或更久后和/或在约5℃的温度下储存约2年或更久后的稳定性的最优选的或优选的实施方案。类似地,肽图结果显示,随着时间的推移,所测量的翻译后修饰百分比几乎没有或没有后续变化。

[0325] 在加速和加压条件下保持的埃万妥单抗DP的结果显示了长时间暴露于加速和应力储存条件的药物产品的预期降解速率。特别值得注意的是,在加速条件(25℃)下保持12个月的DP显示结果符合或超过稳定性的最优选的或优选的实施方案。

[0326] 5℃数据

[0327] 表11:在5℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果

月数	溶液颜色	pH	浊度 (NTU)	微粒物质 亚可见 ≥10μm: 颗粒/小瓶	微粒物质 亚可见 ≥25μm: 颗粒/小瓶	cSDS（还原） 纯度: %	cSDS（还原） AGHC: %	cSDS（还原） 新峰，如与参考物质相比
0	≤BY6, ≤B7, ≤Y6	5.8	4.3	65	2	95.1	4.2	没有>1.0%的新峰
3	≤BY7, ≤B8, ≤Y7	5.7	4.4	71	1	94.9	4.3	没有>1.0%的新峰
6	≤BY7, ≤B9, ≤Y7	5.7	4.1	20	0	95.2	4.1	没有>1.0%的新峰
9	≤BY7, ≤B7, ≤Y7	5.9	4.0	89	5	95.0	4.2	没有>1.0%的新峰
12	≤BY7, ≤B8, ≤Y7	5.5	4.4	23	1	95.1	4.1	没有>1.0%的新峰
18	≤BY7, ≤B8, ≤Y7	5.7	4.2	71	2	95.1	4.1	没有>1.0%的新峰
24	≤BY7, ≤B8, ≤Y7	5.6	4.1	16	1	94.9	未测试	没有>1.0%的新峰
36								

[0328]

[0329]

[0330] 表11:在5℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0331]

月数	cSDS（非还原）		SE HPLC			通过 A_{280} 得到的蛋白质浓度（mg/mL）
	纯度（%）	新峰（%）	主要组分（%）	HMWS（%）	LMWS（%）	
0	98.3	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.2	0.8	<0.1	53.5
3	98.2	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.1	0.8	<0.1	53.4
6	98.1	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.1	0.8	<0.1	53.1
9	98.2	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.1	0.8	<0.1	53.3
12	98.1	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.1	0.8	<0.1	53.9
18	98.0	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.0	0.9	0.1	53.7
24	98.1	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	98.9	1.0	未测试	52.8
36						

[0332] 表11：在5℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0333]

月数	cIEF			EGFR 结合	cMET 结合	聚山梨醇酯 80（%）
	主峰（%）	酸性峰的总和（%）	碱性峰的总和（%）	相对于参考物质的活性（%）	相对于参考物质的活性（%）	
0	76	22	<3.0	108	103	0.0561
3	75	22	<3.0	107	104	0.0563
6	75	22	<3.0	127	104	0.0578
9	74	23	<3.0	92	98	0.0560
12	74	24	2	95	96	0.0597
18	74	23	3	110	100	0.0577
24	73	24	3	101	93	0.0603
36						

[0334] 表11：在5℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0335]

月数	翻译后修饰-氧化部位					
	抗 EGFR HC Met 34*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 103*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 108*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 260/抗 c-Met HC Met 254 (%)	抗 EGFR HC Met 436/抗 c-Met HC Met 430 (%)	抗 EGFR n/a/抗 c-Met LC Trp 32*, Trp 35 (%)
0	0.2	1.6	2.2	2.3	0.7	无重新发布的结果
3	0.2	1.2	2.4	2.1	0.7	1.5
6	0.2	1.5	1.7	2.2	0.7	1.7
9	0.2	1.2	3.2	2.4	0.8	2
12	0.4	1.8	1.1	2.8	1.1	1.1
18	0.3	1.7	1.8	2.5	1.0	1.2
24	1.0	2.4	2.5	3.3	1.5	1.5
36						

[0336] 表11:在5℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0337]

月数	翻译后修饰-脱酰胺部位		
	抗 EGFR HC Asn 333*/抗 Met HC Asn 327 (%)	抗 EGFR HC Asn 392/抗 c-Met HC Asn 386，Asn 391 (%)	抗 EGFR n/a/抗 c-Met HC Asn 55*，59* (%)
0	0.7	2.7	4.4
3	0.7	2.2	3.7
6	0.7	2.6	3.6
9	0.8	2	4.4
12	0.8	2.8	3.7
18	0.9	3.1	3.7
24	未测试	3.0	4.2
36			

[0338] 表11:在5℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0339]

月数	翻译后修饰-异构化部位	
	抗 EGFR HC Asp 53*，Asp 54*/抗 c-Metn/a (%)	抗 EGFR HC Asp 99*/抗 c-Met n/a (%)
0	nr	1
3	0.4	1
6	0.5	1.2
9	0.5	1.3
12	0.8	1.2
18	0.3	1.6
24	0.5	1.6
36		

[0340] 25℃数据

[0341] 表12:在25℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果

[0342]

月数	溶液颜色	pH	浊度（NTU）	微粒物质 亚可见 ≥10μm：颗粒/小瓶	微粒物质 亚可见 ≥25μm：颗粒/小瓶	cSDS（还原） 纯度：%	cSDS（还原） AGHC：%	cSDS（还原） 新峰
0	≤BY6，≤B7，≤Y6	5.8	4.3	65	2	95.1	4.2	与参考物质相比没有>1.0%的新峰
3	≤BY6，≤B7，≤Y6	5.7	4.3	32	0	94.6	4.1	与参考物质相比没有>1.0%的新峰
6	≤BY7，≤B7，≤Y7	5.8	4	13	0	93.9	4.1	与参考物质相比没有>1.0%的新峰
9	≤BY7，≤B8，≤Y7	5.7	4.1	51	1	92.7	4.2	与参考物质相比没有>1.0%的新峰
12	≤BY6，≤B6，≤Y6	5.7	5	40	3	91.7	4.1	与参考物质相比没有>1.0%的新峰

[0343] 表12：在25℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0344]

月数	cSDS（非还原） 纯度（%）	cSDS（非还原） 新峰(%)	SE HPLC 主要组分（%）	SE HPLC HMWS(%)	SE HPLC LMWS(%)	通过A_{280}得到的蛋白质浓度（mg/mL）
0	98.3	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.2	0.8	<0.1	53.5
3	97.4	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	98.9	0.9	0.2	52.1
6	96.2	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	98.5	1.0	0.5	53.2
9	95.5	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	98.3	1.0	0.7	53.1
12	94.5	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	98.0	1.1	0.9	53.7

[0345] 表12：在25℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0346]

月数	cIEF 主峰（%）	cIEF 酸性峰的总和（%）	cIEF 碱性峰的总和（%）	EGFR结合相对于参考物质的活性（%）	cMET结合相对于参考物质的活性（%）	聚山梨醇酯80（%）
0	76	22	2	108	103	0.0561
3	64	32	4	93	101	0.0552
6	56	39	5	82	96	0.0550
9	52	43	5	86	96	0.0578
12	46	48	6	79	89	0.055

[0347] 表12：在25℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0348]

月数	翻译后修饰-氧化部位					
	抗 EGFR HC Met 34*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 103*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 108*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 260/抗 c-Met HC Met 254 (%)	抗 EGFR HC Met 436/抗 c-Met HC Met 430 (%)	抗 EGFR n/a/抗 c-Met LC Trp 32*，Trp 35 (%)
0	0.2	1.6	2.2	2.3	0.7	无重新发布的结果
3	0.5	1.7	3.1	2.7	1.2	2.5
6	0.4	2.2	1.9	2.6	0.8	4.1
9	0.5	2.3	1.1	2.9	1.2	3.2
12	0.4	2.4	1.3	2.9	1.2	4.0

[0349]

[0350] 表12:在25℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0351]

月数	翻译后修饰-脱酰胺部位		
	抗 EGFR HC Asn 333*/抗 c-Met HC Asn 327 (%)	抗 EGFR HC Asn 392/抗 c-Met HC Asn 386，Asn 391 (%)	抗 EGFR n/a/抗 c-Met HC Asn 55*，59* (%)
0	0.7	2.7	4.4
3	2.8	3.6	4.8
6	6.3	3.6	5.4
9	未测试	3.9	6.8
12	未测试	4.5	7.8

[0352] 表12:在25℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0353]

月数	翻译后修饰-异构化部位	
	抗 EGFR HC Asp 53*，Asp 54*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Asp 99*/抗 c-Met n/a (%)
0	nr	1
3	0.7	3.6
6	1.3	1.8
9	2.7	6.1
12	3.1	7.4

[0354] 40℃数据

[0355] 表13:在40℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果

[0356]

月数	溶液颜色	pH	浊度 (NTU)	微粒物质 亚可见 ≥10μm：颗粒/小瓶	微粒物质 亚可见 ≥25μm：颗粒/小瓶	cSDS（还原） 纯度：%	cSDS（还原） AGHC：%	cSDS（还原） 新峰
0	≤BY6，≤B7，≤Y6	5.8	4.3	65	2	95.1	4.2	与参考物质相比没有>1.0%的新峰
1	≤BY6，≤B6，≤Y6	5.8	5.2	167	6	92.2	4.3	与参考物质相比没有>1.0%的新峰
3	≤BY6，≤B6，≤Y6	5.7	4.9	32	1	88.4	4.2	与参考物质相比没有>1.0%的新峰
6	≤BY6，≤B6，≤Y6	5.7	5	28	1	82.7	4.4	峰 2：1.032% PI 12.82

[0357] 表13：在40℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0358]

月数	cSDS（非还原） 纯度（%）	cSDS（非还原） 新峰	SE HPLC 主要组分（%）	SE HPLC HMWS（%）	SE HPLC LMWS（%）	通过 A_{280} 得到的蛋白质浓度 (mg/mL)
0	98.3	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	99.2	0.8	<0.1	53.5
1	95.5	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	98.4	1.0	0.4	52.7
3	90.7	与参考物质相比没有>1.0%的新峰	96.5	1.9	1.6	53.7
6	82.4	峰 1：1.19% PI 12.89	91.5	3.9	4.6	53.3

[0359] 表13：在40℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0360]

月数	cIEF 主峰（%）	cIEF 酸性峰的总和（%）	cIEF 碱性峰的总和（%）	EGFR 结合 相对于参考物质的活性（%）	cMET 结合 相对于参考物质的活性（%）	聚山梨醇酯80（%）
0	76	22	<3.0	108	103	0.0561
1	46	47	6	99	97	0.0560
3	23	73	5	63	91	0.0541
6	6	93	<3.0	33	74	0.0543

[0361] 表13：在40℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0362]

月数	翻译后修饰-氧化部位					
	抗 EGFR HC Met 34*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 103*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 108*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Met 260/抗 c-Met HC Met 254 (%)	抗 EGFR HC Met 436/抗 c-Met HC Met 430 (%)	抗 EGFR n/a/抗 c-Met LC Trp 32*，Trp 35 (%)
0	0.2	1.6	2.2	2.3	0.7	无重新发布的结果
1	0.4	1.6	3.1	2.8	0.9	1.8
3	0.6	2.5	4.5	3.4	1.4	7.7
6	0.4	7	5.1	4	1.4	18.8

[0363] 表13：在40℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0364]

月数	翻译后修饰-脱酰胺部位		
	抗 EGFR HC Asn 333*/抗 c-Met HC Asn 327 (%)	抗 EGFR HC Asn 392/抗 c-Met HC Asn 386，Asn 391 (%)	抗 EGFR n/a/抗 c-Met HC Asn 55*，59* (%)
0	0.7	2.7	4.4
1	10.8	4.3	5.8
3	27.9	6.2	10.2
6	51.5	9.5	15.9

[0365] 表13：在40℃下储存的埃万妥单抗药物产品的稳定结果(续)

[0366]

月数	翻译后修饰-异构化部位	
	抗 EGFR HC Asp 53*，Asp 54*/抗 c-Met n/a (%)	抗 EGFR HC Asp 99*/抗 c-Met n/a (%)
0	nr	1
1	2.2	5.6
3	4.5	21
6	6.5	18.3

[0367] 本领域的技术人员将会知道可对本发明的优选实施方案作出许多改变和修改，而且此类改变和修改可在不脱离本发明的实质的情况下进行。因此，所附权利要求书旨在覆盖落入本发明的真实实质和范围内的所有此类等同变化。

[0368] 本文档所引用或描述的每项专利、专利申请和公布的公开内容均据此全文以引用方式并入本文。

[0369] 表14：序列

[0370]

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO: 1 HCDR1，EGFR 结合臂（Kabat 方法）	TYGMH
SEQ ID NO: 2 HCDR2，EGFR 结合臂（Kabat 方法）	VIWDDGSYKYYGDSVKG
SEQ ID NO: 3 HCDR3，EGFR 结合臂（Kabat 方法）	DGITMVRGVMKDYFDY
SEQ ID NO: 4 LCDR1，EGFR 结合臂（Kabat 方法）	RASQDISSALV
SEQ ID NO: 5 LCDR2，EGFR 结合臂（Kabat 方法）	DASSLES
SEQ ID NO: 6 LCDR3，EGFR 结合臂（Kabat 方法）	QQFNSYPLT
SEQ ID NO: 7 HCDR1，c-Met 结	SYGIS

[0371]

合臂（Kabat 方法）	
SEQ ID NO: 8 HCDR2，c-Met 结合臂（Kabat 方法）	WISAYNGYTNYAQKLQG
SEQ ID NO: 9 HCDR3，c-Met 结合臂（Kabat 方法）	DLRGTNYFDY
SEQ ID NO: 10 LCDR1，c-Met 结合臂（Kabat 方法）	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 11 LCDR2，c-Met 结合臂（Kabat 方法）	AASSLLS
SEQ ID NO: 12 LCDR3，c-Met 结合臂（Kabat 方法）	QQANSFPIT
SEQ ID NO: 13 VH1，EGFR 结合臂	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLV TVSS
SEQ ID NO: 14 VL1，EGFR 结合臂	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 15 VH2，c-Met 结合臂	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPG HGLEWMGWISAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 16 VL2，c-Met 结合臂	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKA PKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 17 HC1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 18 LC1	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 19 HC2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPG HGLEWMGWISAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL

[0372]

	RSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 20 LC2	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKA PKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQANSFPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

序列表

<110> Janssen Biotech, Inc.
Kupec, Jessica
Schreyer, Melissa
Stahl, Patrick
Torne, Satyen

<120> 包含双特异性EGFR/C-MET抗体的稳定制剂

<130> JBI6337WOPCT1

<140> 待转让

<141> 2021-08-25

<150> US 63/070,440

<151> 2020-08-26

<160> 20

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR1,EGFR结合臂

<400> 1

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2,EGFR结合臂

<400> 2

Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3,EGFR结合臂
<400> 3
Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR1,EGFR结合臂
<400> 4
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Val
1 5 10
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2,EGFR结合臂
<400> 5
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR3,EGFR结合臂
<400> 6
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HCDR1,c-Met结合臂
<400> 7
Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2,c-Met结合臂

<400> 8

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3,c-Met结合臂

<400> 9

Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1,c-Met结合臂

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR2,c-Met结合臂

<400> 11

Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser
1 5

<210> 12

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR3,c-Met结合臂
<400> 12
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
1 5
<210> 13
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VH,EGFR结合臂
<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VL,EGFR结合臂
<400> 14
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VH,c-Met结合臂
<400> 15
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 107
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> VL,c-Met结合臂
<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重链1
<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser
405 410 415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455

<210> 18

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链1

<400> 18

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 19
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重链2
<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 20
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 轻链2
<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210