

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393060** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.01.25

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.26

(54) **КОМПОЗИЦИЯ НОВОГО БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИ-CD3/CD20 ПОЛИПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА**

(31) **202010733597.6**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.07.27**

**Чжу Ювэй, Ли Инчунь, Чэн Яньцзюй
(CN)**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2021/108455**

(74) Представитель:

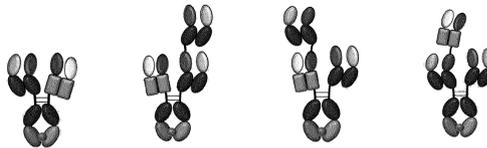
(87) **WO 2022/022464 2022.02.03**

**Харин А.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В.,
Стойко Г.В., Галухина Д.В. (RU)**

(71) Заявитель:

**ЧИА ТАЙ ТЯНЬЦИН
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,
ЛТД. (CN)**

(57) Настоящее изобретение относится к композиции нового биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса, содержащего первую антигенсвязывающую часть и вторую антигенсвязывающую часть. В частности, композиция включает жидкую композицию и лиофилизированный состав.



E17R-1 F16-1 F18R-1 F17R-1

TCR	T2/T3 (анти-CD3)	U2/U3 (анти-CD20)

A1

202393060

202393060

A1

КОМПОЗИЦИЯ НОВОГО БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИ-CD3/CD20 ПОЛИПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящее изобретение испрашивает приоритет по китайской патентной заявке № 202010733597.6, поданной 27 июля 2020 года, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтической композиции и в частности относится к композиции на основе биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса и ее применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Утверждения в разделе «Уровень техники» предоставляют исключительно информацию, относящуюся к настоящему изобретению, и не обязательно представляют собой предшествующий уровень техники.

Поскольку биологические лекарственные средства непрерывно разрабатываются, терапевтические антитела стали основными лекарственными средствами наиболее эффективными для пациентов с раком, аутоиммунными заболеваниями, воспалением и другими заболеваниями. Однако моноклональные антитела направлены против отдельных мишеней, и поскольку развитие таких заболеваний, как рак, является многофакторным и включает несколько сигнальных путей, иммунотерапии с одной мишенью, по-видимому, недостаточно для уничтожения раковых клеток.

CD20 представляет собой активированный гликозилированный фосфопротеин, экспрессируемый на поверхностях В-лимфоцитов. Ритуксимаб (химерное анти-CD20 моноклональное антитело (далее также называемое «mAb»)) был одобрен FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств) для лечения лимфопролиферативных расстройств еще в 1997 году. По мере изучения структуры белка и молекулярной функции CD20 разработали терапевтическое антитело нового поколения, нацеленное на CD20, офатумумаб (полностью человеческое анти-CD20 терапевтическое антитело), которое нацелено на другой эпитоп CD20, более близкий к поверхности клетки, чем ритуксимаб, что приводит к более медленной диссоциации и более стабильному связыванию, чем у ритуксимаба (Laurenti L, Innocenti I, Autore F, et al. New developments in the management of chronic lymphocytic leukemia: role of ofatumumab.

Onco Targets Ther. 2016 Jan 20; 9: 421-9). Однако почти все пациенты с фолликулярной лимфомой и пациенты с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) и около половины пациентов с агрессивной В-клеточной лимфомой (например, диффузной В-крупноклеточной лимфомой) будут иметь рецидив или страдать от повторного проявления заболевания после лечения анти-CD20 моноклональными антителами (Lim SH, Beers SA, French RR, et al. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. Haematologica. 2010 Jan; 95(1):135-43).

Т-клеточный рецептор CD3 представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех отдельных цепей (γ -цепь CD3, δ -цепь CD3 и две ϵ -цепи CD3). Эти четыре цепи связываются с молекулой, называемой Т-клеточным рецептором (TCR), и внутриклеточной ζ -цепью для генерации сигналов активации в Т-лимфоцитах. TCR, ζ -цепь и молекула CD3 составляют комплекс TCR; TCR служит субъединицей для распознавания и связывания антигена, и CD3 служит субъединицей, ответственной за передачу антигенной стимуляции сигнальному пути и, в конечном счете, за регуляцию активности Т-клеток. Белок CD3 присутствует почти во всех Т-клетках. Комплекс CD3-TCR модулирует функцию Т-клеток как во врожденном, так и в адаптивном иммунных ответах, а также клеточные и гуморальные иммунные функции, включая удаление патогенных организмов и контроль роста опухоли посредством цитотоксических эффектов. Мышиные моноклональные антитела, нацеленные на CD3 человека, такие как ОКТ3 (Kung et al, Science, 206: 347-9 (1979)), представляют собой первое поколение антител к CD3, разработанных для терапии. Несмотря на сильную иммуносупрессивную активность ОКТ3, его клиническое применение затруднено тяжелыми побочными эффектами, связанными с его иммуногенностью и митогенным потенциалом (Chatenoud, Nature Reviews, 3:123-132 (2003)). ОКТ3 индуцирует антиглобулиновые ответы, способствуя его быстрому клиренсу и нейтрализации (Chatenoud et al., Eur. J. Immunol., 137:830-8 (1982)). Кроме того, ОКТ3 индуцирует обширное высвобождение цитокинов в организме (Hirsch et al., J. Immunol, 142:737-43 (1989)).

Биспецифическое антитело, нацеленное на CD3 и CD20, может связываться как с Т-клеткой, так и с В-клеткой. Как только биспецифическое антитело связывается с CD3-положительной Т-клеткой и с CD20-положительной В-клеткой, образование цитолитических синапсов будет стимулироваться, и цитотоксическая Т-клетка, таким образом, высвобождает перфорин и гранзимы, индуцируя апоптоз В-клетки. Однако поскольку лекарственные средства на основе биспецифических антител имеют большую молекулярную массу и сложную структуру, они подвержены деградации, агрегации или нежелательным химическим модификациям и тому подобному и становятся

нестабильными, особенно в условиях высоких температур или напряжении сдвига (например, во время транспортировки). С точки зрения получения биспецифических антител, подходящих для получения и введения, и поддержания их биологической активности и стабильности во время хранения и последующего применения, разработка стабильных фармацевтических композиций на основе биспецифических антител имеет особое значение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Согласно настоящему изобретению биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс может быть составлен в форме жидкости или лиофилизированного порошка. Композиция по настоящему изобретению способна достигать стабилизирующего эффекта, где биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс по существу сохраняет свою физическую и/или химическую стабильность и/или биологическую активность после хранения. В частности, композиция по настоящему изобретению имеет низкий уровень агрегации биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса и имеет небольшой MFI микрочастиц и нерастворимых микрочастиц, а также хорошую биологическую активность, что делает ее пригодной для введения субъекту.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к жидкой композиции, содержащей биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс и буфер, где буфер включает один или комбинацию нескольких из буфера на основе соли гистидина, сукцинатного буфера и цитратного буфера.

В некоторых вариантах осуществления буфер на основе соли гистидина представляет собой буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, сукцинатный буфер представляет собой буфер на основе янтарной кислоты и сукцината натрия, и цитратный буфер представляет собой буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия.

В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции представляет собой один или комбинацию нескольких из буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, буфера на основе янтарной кислоты и сукцината натрия и буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции представляет собой буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в

концентрации от около 0,1 до около 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 0,5 до около 20 мг/мл, например, около 0,5 мг/мл, около 1 мг/мл, около 1,5 мг/мл, около 2 мг/мл, около 2,5 мг/мл, около 3 мг/мл, около 3,5 мг/мл, около 4 мг/мл, около 4,5 мг/мл, около 5 мг/мл, около 5,5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 6,5 мг/мл, около 7 мг/мл, около 7,5 мг/мл, около 8 мг/мл, около 8,5 мг/мл, около 9 мг/мл, около 9,5 мг/мл, около 10 мг/мл, около 11 мг/мл, около 12 мг/мл, около 13 мг/мл, около 14 мг/мл, около 15 мг/мл, около 16 мг/мл, около 17 мг/мл, около 18 мг/мл, около 19 мг/мл или около 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 1 до около 20 мг/мл, от около 2 до около 10 мг/мл, от около 2 до около 5 мг/мл или от около 2 до около 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 0,1 до 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 0,5 до 20 мг/мл, например, 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4 мг/мл, 4,5 мг/мл, 5 мг/мл, 5,5 мг/мл, 6 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7 мг/мл, 7,5 мг/мл, 8 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9 мг/мл, 9,5 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл, 16 мг/мл, 17 мг/мл, 18 мг/мл, 19 мг/мл или 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 1 до 20 мг/мл, от 2 до 10 мг/мл, от 2 до 5 мг/мл или от 2 до 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации 2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный

комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН от около 5,0 до около 7,5. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН от около 5,0 до около 6,5, например, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН от около 6,0 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН около 6. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН около 6,2. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН от 5,0 до 7,5. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН от 5,0 до 6,5, например, 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 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН от 6,0 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН 6. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН 6,2. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет рН 6,5.

В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет концентрацию от около 1 до около 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет концентрацию от около 5 до около 20 мМ, например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет концентрацию около 10 мМ.

В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет концентрацию от 1 до 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления

буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет концентрацию от 5 до 20 мМ, например, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ или 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер в вышеупомянутой жидкой композиции имеет концентрацию 10 мМ.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 6,5, например, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН около 6. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН около 6,2. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН от 5,0 до 7,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН от 5,0 до 6,5, например, 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 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН от 6,0 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН 6. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН 6,2. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция имеет рН 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция дополнительно содержит регулятор осмотического давления и/или стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления регулятор осмотического давления и/или стабилизатор содержат сахарид. В данном контексте «сахарид» может представлять собой моносахарид, дисахарид, трисахарид, полисахарид, сахарный спирт или восстанавливающий сахар и невосстанавливающий сахар, например, глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, фруктозу, декстран, глицерин, эритрит, глицерин, арабитол, ксилит, сорбит, маннит, мелибиозу, мелезитозу, рафинозу, маннотриозу, стахиозу, мальтозу, лактулозу, мальтулозу, сорбит, мальтит, лактит, изомальтулозу и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления регулятор осмотического давления и/или стабилизатор дополнительно содержат один или более из хлорида натрия, аргинин гидрохлорида, глицина и пролина. В некоторых вариантах осуществления регулятор осмотического давления и/или стабилизатор в вышеупомянутой жидкой композиции

представляют собой дисахариды, такие как трегалоза или сахароза. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит трегалозу. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит трегалозу и один или более из хлорида натрия, аргинин гидрохлорида, глицина и пролина. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит сахарозу и один или более из хлорида натрия, аргинин гидрохлорида, глицина и пролина. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит трегалозу и хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит трегалозу и аргинин гидрохлорид. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит сахарозу и хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит сахарозу и аргинин гидрохлорид. В композиции согласно настоящей заявке сахариды включают сахариды и/или их гидраты; например, трегалоза включает трегалозу и/или ее гидрат, такой как дигидрат трегалозы.

В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 150 до около 320 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около 180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 230 до около 240 мМ или от около 230 до около 235 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 233 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 234 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ, около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в

концентрации около 232,6 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахарид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 233,7 мМ.

В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 150 до около 320 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около 180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 230 до около 240 мМ или от около 230 до около 235 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 233 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ, около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 232,6 мМ.

В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 10 до около 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 20 до около 200 мМ, например, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 150 мМ, около 160 мМ, около 170 мМ, около 180 мМ, около 190 мМ или около 200 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 50 до около 150 мМ, от около 100 до около 110 мМ или от около 100 до около 105 мМ. В

некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 102,7 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 103 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 6 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления аргинин гидрохлорид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 100 мМ.

В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 10 до 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 20 до 200 мМ, например, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ, 105 мМ, 110 мМ, 115 мМ, 120 мМ, 125 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 145 мМ, 150 мМ, 160 мМ, 170 мМ, 180 мМ, 190 мМ или 200 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 50 до 150 мМ, от 100 до 110 мМ или от 100 до 105 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 102,7 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 103 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации 6 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления аргинин гидрохлорид в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации 100 мМ.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, которое может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера, тритона, додецилсульфоната натрия, лаурилсульфоната натрия, октилгликозида натрия, лаурилсульфобетаина, миристилсульфобетаина, линолеилсульфобетаина, стеарилсульфобетаина, лаурилсаркозина, миристилсаркозина, линолеилсаркозина, стеарилсаркозина, линолеилбетаина, миристилбетаина, цетилбетаина, лаурамидопропилбетаина, кокамидопропилбетаина, линолеамидопропилбетаина, миристамидопропилбетаина, пальмидопропилбетаина, изостеарамидопропилбетаина, миристамидопропилдиметиламина, палмидопропилдиметиламина, изостеарамидопропилдиметиламина, натрия метилкокоила, натрия метилолеилтаурата, полиэтиленгликоля,

полипропиленгликоля, сополимера этилена и пропиленгликоля и т. п. Предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит полисорбат 80 (также известный как твин 80).

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 0,001 до около 0,1 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 0,005 до около 0,08 мас./об.%, например, около 0,005 мас./об.%, около 0,006 мас./об.%, около 0,007 мас./об.%, около 0,008 мас./об.%, около 0,009 мас./об.%, около 0,01 мас./об.%, около 0,015 мас./об.%, около 0,02 мас./об.%, около 0,025 мас./об.%, около 0,03 мас./об.%, около 0,035 мас./об.%, около 0,04 мас./об.%, около 0,045 мас./об.%, около 0,05 мас./об.%, около 0,06 мас./об.%, около 0,07 мас./об.% или около 0,08 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от около 0,01 до около 0,04 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации около 0,02 мас./об.%.

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 0,001 до 0,1 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 0,005 до 0,08 мас./об.%, например, 0,005 мас./об.%, 0,006 мас./об.%, 0,007 мас./об.%, 0,008 мас./об.%, 0,009 мас./об.%, 0,01 мас./об.%, 0,015 мас./об.%, 0,02 мас./об.%, 0,025 мас./об.%, 0,03 мас./об.%, 0,035 мас./об.%, 0,04 мас./об.%, 0,045 мас./об.%, 0,05 мас./об.%, 0,06 мас./об.%, 0,07 мас./об.% или 0,08 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации от 0,01 до 0,04 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутой жидкой композиции присутствует в концентрации 0,02 мас./об.%.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к жидкой композиции, содержащей биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс и один или более из буфера, регулятора осмотического давления, и/или стабилизатора, и/или поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция по настоящему изобретению содержит биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс и буфер, регулятор осмотического давления и/или стабилизатор и поверхностно-активное вещество.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буфера,

(c) от около 150 до около 320 мМ сахара; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от около 10 до около 300 мМ глицина и от около 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% поверхностно-активного вещества,

где жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буфера,

(c) от около 150 до около 320 мМ трегалозы; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от около 10 до около 300 мМ глицина и от около 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80,

где жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буфера,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, от около 20 до около 200 мМ глицина и от около 20 до около 200 мМ пролина; и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80,

где жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса (например, около 0,5 мг/мл, около 1 мг/мл, около 1,5 мг/мл, около 2 мг/мл, около 2,5 мг/мл, около 3 мг/мл, около 3,5 мг/мл, около 4 мг/мл, около 4,5 мг/мл, около 5 мг/мл, около 5,5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 6,5 мг/мл, около 7 мг/мл, около 7,5 мг/мл, около 8 мг/мл, около 8,5 мг/мл, около 9 мг/мл, около 9,5 мг/мл, около 10 мг/мл, около 11 мг/мл, около 12 мг/мл, около 13 мг/мл, около 14 мг/мл, около 15 мг/мл, около 16 мг/мл, около 17 мг/мл, около 18 мг/мл, около 19 мг/мл или около 20 мг/мл),

(b) от около 5 до около 20 мМ буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия (например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около 20 мМ),

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы (например, от около 180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ; или около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ, около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ); необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, от около 20 до около 200 мМ глицина и от около 20 до около 200 мМ пролина; и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 (например, около 0,005 мас./об.%, около 0,006 мас./об.%, около 0,007 мас./об.%, около 0,008 мас./об.%, около 0,009 мас./об.%, около 0,01 мас./об.%, около 0,015 мас./об.%, около 0,02 мас./об.%, около 0,025 мас./об.%, около 0,03 мас./об.%, около 0,035 мас./об.%, около 0,04 мас./об.%, около 0,045 мас./об.%, около 0,05 мас./об.%, около 0,06 мас./об.%, около 0,07 мас./об.% или около 0,08 мас./об.%),

где жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5 (например, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5).

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция

содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ буфера (например, одного или более из буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, буфера на основе янтарной кислоты и сукцината натрия и буфера на основе лимонной кислоты и цитратного буфера),

(c) от около 150 до около 320 мМ сахара; и может содержаться одно из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от около 10 до около 300 мМ глицина и от около 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% поверхностно-активного вещества,

где жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса (например, около 0,5 мг/мл, около 1 мг/мл, около 1,5 мг/мл, около 2 мг/мл, около 2,5 мг/мл, около 3 мг/мл, около 3,5 мг/мл, около 4 мг/мл, около 4,5 мг/мл, около 5 мг/мл, около 5,5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 6,5 мг/мл, около 7 мг/мл, около 7,5 мг/мл, около 8 мг/мл, около 8,5 мг/мл, около 9 мг/мл, около 9,5 мг/мл, около 10 мг/мл, около 11 мг/мл, около 12 мг/мл, около 13 мг/мл, около 14 мг/мл, около 15 мг/мл, около 16 мг/мл, около 17 мг/мл, около 18 мг/мл, около 19 мг/мл или около 20 мг/мл),

(b) от около 5 до около 20 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина или буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия (например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около 20 мМ),

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы или сахарозы (например, около 180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ; или около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ,

около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ) и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида (например, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 150 мМ, около 160 мМ, около 170 мМ, около 180 мМ, около 190 мМ или около 200 мМ), и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбатат 20 (например, около 0,005 мас./об.%, около 0,006 мас./об.%, около 0,007 мас./об.%, около 0,008 мас./об.%, около 0,009 мас./об.%, около 0,01 мас./об.%, около 0,015 мас./об.%, около 0,02 мас./об.%, около 0,025 мас./об.%, около 0,03 мас./об.%, около 0,035 мас./об.%, около 0,04 мас./об.%, около 0,045 мас./об.%, около 0,05 мас./об.%, около 0,06 мас./об.%, около 0,07 мас./об.% или около 0,08 мас./об.%),

где жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5 (например, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5).

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина или буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) от около 150 до около 320 мМ трегалозы или сахарозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20,

где жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина или буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы или сахарозы и от около 20 до около

200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) от около 150 до около 320 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буфера,

(c) от около 150 до около 320 мМ трегалозы и от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция

содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буфера,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 1 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буфера,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,01 до около 0,04 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где жидкая композиция имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 2 до около 3 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 10 мМ буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) около 233 мМ трегалозы, и

(d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80, где жидкая композиция имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

(a) от около 2 до около 3 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 10 мМ буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) около 232,6 мМ трегалозы, и

(d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80, где жидкая композиция имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

- (a) около 5 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
 - (b) около 10 мМ цитратного буфера,
 - (c) около 233 мМ трегалозы и около 103 мМ хлорида натрия, и
 - (d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,
- где жидкая композиция имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

- (a) около 5 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
 - (b) около 10 мМ цитратного буфера,
 - (c) около 232,6 мМ трегалозы и около 102,7 мМ хлорида натрия, и
 - (d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,
- где жидкая композиция имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

- (a) около 5 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
 - (b) около 10 мМ цитратного буфера,
 - (c) около 88 мг/мл дигидрата трегалозы и около 6 мг/мл хлорида натрия, и
 - (d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,
- где жидкая композиция имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция содержит:

- (a) около 5 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
 - (b) около 10 мМ буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,
 - (c) около 88 мг/мл дигидрата трегалозы и около 6 мг/мл хлорида натрия, и
 - (d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,
- где жидкая композиция имеет рН около 6.

Настоящее изобретение также относится к способу получения вышеупомянутой жидкой композиции, который включает стадию приведения биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса, описанного выше, в контакт с буфером, например, замену биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса на буфер, где буфер предпочтительно представляет собой цитратный буфер, более предпочтительно буфер на основе цитратной кислоты и цитрата натрия, и имеет концентрацию от около 5 до около 20 мМ, например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около

20 мМ. В некоторых вариантах осуществления жидкость имеет концентрацию около 10 мМ. Буфер имеет рН от около 5,0 до около 6,5, например, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН около 6. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН около 6,2. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН около 6,5.

Настоящее изобретение также относится к способу получения вышеупомянутой жидкой композиции, который включает приведение биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса, описанного выше, в контакт с буфером и дополнительно включает добавление к полученному раствору регулятора осмотического давления и/или стабилизатора и поверхностно-активного вещества, такого как трегалоза и полисорбат 80; необязательно также могут быть добавлены в любом порядке одно или более из следующего: хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин и пролин; где указанный буфер имеет предпочтительную концентрацию от около 5 до около 20 мМ, например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет концентрацию около 10 мМ. Буфер имеет рН от около 5,0 до около 6,5, например, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН около 6. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН около 6,2. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН около 6,5.

В настоящем изобретении также предложен способ получения лиофилизата, содержащего биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, который включает стадию лиофилизации вышеупомянутой жидкой композиции. В некоторых вариантах осуществления лиофилизацию проводят с использованием способа, хорошо известного в данной области техники, и он включает, но не ограничивается, стадии предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки. Специалистам в данной области техники понятно, что любой способ удаления воды из жидкой композиции, описанной в настоящем изобретении, подходит для использования в настоящем изобретении.

В настоящем изобретении также предложен лиофилизат, содержащий биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, который получают с использованием вышеупомянутого способа получения лиофилизата.

В настоящем изобретении также предложен лиофилизат, содержащий биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, который способен образовывать вышеупомянутую жидкую композицию при восстановлении.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизат содержит:

- (a) около 2 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
- (b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,
- (c) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,
- (d) около 0,233 ммоль трегалозы, и
- (e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизат имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизат содержит:

- (a) около 2 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
- (b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,
- (c) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,
- (d) около 0,2326 ммоль трегалозы, и
- (e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизат имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизат содержит:

- (a) около 2 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
- (b) около 0,001 ммоль лимонной кислоты,
- (c) около 0,009 ммоль цитрата натрия,
- (d) около 0,23 ммоль трегалозы, и
- (e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное,

2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизат имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизат содержит:

- (a) около 5 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
- (b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,
- (c) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,
- (d) около 0,233 ммоль трегалозы и 6 мг хлорида натрия, и
- (e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизат имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизат содержит:

- (a) около 5 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
- (b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,
- (c) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,
- (d) около 0,2326 ммоль трегалозы и 6 мг хлорида натрия, и
- (e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизат имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизат содержит:

- (a) около 5 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
- (b) около 0,001 ммоль лимонной кислоты,
- (c) около 0,009 ммоль цитрата натрия,
- (d) около 0,23 ммоль трегалозы и 6 мг хлорида натрия, и
- (e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или

дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизат имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизат стабилен при 2-8 °С в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления лиофилизат стабилен при 25 °С в течение по меньшей мере 1 месяца или по меньшей мере 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления лиофилизат стабилен при 40 °С в течение по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 14 дней или по меньшей мере 28 дней. В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, который представляет собой раствор, полученный путем восстановления вышеупомянутого лиофилизата.

В настоящем изобретении также предложен способ получения вышеупомянутой фармацевтической композиции, который включает стадию восстановления вышеупомянутого лиофилизата, причем раствор для восстановления включает, но не ограничивается, воду для инъекций, физиологический раствор или раствор глюкозы; вода для инъекций является предпочтительной.

В настоящем изобретении также предложено изделие, включающее контейнер, содержащий жидкую композицию, или ее лиофилизат, или фармацевтическую композицию, полученную путем восстановления лиофилизата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция стабильна при 2-8 °С в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая жидкая композиция стабильна при 40 °С в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель или по меньшей мере 6 недель.

Жидкую композицию, или ее лиофилизат, или фармацевтическую композицию, полученную путем восстановления лиофилизата, описанного в настоящем документе, можно вводить внутривенно (например, внутривенное капельное введение), внутримышечно, подкожно, парентерально, спинально или наочно (например, путем инъекции или болюсной инъекции). Жидкую композицию, или ее лиофилизат, или

фармацевтическую композицию, полученную путем восстановления лиофилизата, описанного в настоящем документе, можно разбавить подходящим разбавителем до подходящей концентрации перед введением для обеспечения наилучшего желаемого ответа (например, терапевтического ответа).

Настоящее изобретение также относится к применению жидкой композиции, или лиофилизата, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или изделия, описанного в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с CD20.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с CD20, представляет собой рак; предпочтительно рак выбран из группы, состоящей из, но не ограничивающейся, лимфомы, рака легкого, рака печени, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы, меланомы, глиобластомы, рака предстательной железы, рака пищевода и рака желудка.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с CD20, представляет собой В-клеточную лимфому, необязательно ходжкинскую лимфому или неходжкинскую лимфому, где неходжкинская лимфома включает: диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны (МЗЛ), лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (хронический лимфоцитарный лейкоз, ХЛЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) или макроглобулинемию Вальденстрема (WM).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс и дополнительно содержащей один или более из буферного агента, регулятора осмотического давления, и/или стабилизатора, и/или поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой лиофилизированный состав, содержащий биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс и буферный агент, регулятор осмотического давления и/или стабилизатор и поверхностно-активное вещество.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к стабильному лиофилизированному составу, содержащему биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс и буферный агент, где буферный агент включает один или комбинацию нескольких из буферного агента на основе соли гистидина, сукцинатного буферного агента и цитратного буферного агента.

В некоторых вариантах осуществления буферный агент на основе соли гистидина

представляет собой буферный агент на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, сукцинатный буферный агент представляет собой буферный агент на основе янтарной кислоты и сукцината натрия, и цитратный буферный агент представляет собой буферный агент на основе лимонной кислоты и цитрата натрия.

В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе представляет собой один или комбинацию нескольких из буферных агентов на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, буферных агентов на основе янтарной кислоты и сукцината натрия и буферных агентов на основе лимонной кислоты и цитрата натрия. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе представляет собой буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 0,1 до около 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 0,5 до около 20 мг/мл, например, около 0,5 мг/мл, около 1 мг/мл, около 1,5 мг/мл, около 2 мг/мл, около 2,5 мг/мл, около 3 мг/мл, около 3,5 мг/мл, около 4 мг/мл, около 4,5 мг/мл, около 5 мг/мл, около 5,5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 6,5 мг/мл, около 7 мг/мл, около 7,5 мг/мл, около 8 мг/мл, около 8,5 мг/мл, около 9 мг/мл, около 9,5 мг/мл, около 10 мг/мл, около 11 мг/мл, около 12 мг/мл, около 13 мг/мл, около 14 мг/мл, около 15 мг/мл, около 16 мг/мл, около 17 мг/мл, около 18 мг/мл, около 19 мг/мл или около 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 1 до около 20 мг/мл, от около 2 до около 10 мг/мл, от около 2 до около 5 мг/мл или от около 2 до около 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20

полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 0,1 до 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 0,5 до 20 мг/мл, например, 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4 мг/мл, 4,5 мг/мл, 5 мг/мл, 5,5 мг/мл, 6 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7 мг/мл, 7,5 мг/мл, 8 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9 мг/мл, 9,5 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл, 16 мг/мл, 17 мг/мл, 18 мг/мл, 19 мг/мл или 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 1 до 20 мг/мл, от 2 до 10 мг/мл, от 2 до 5 мг/мл или от 2 до 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/C20 полипептидный комплекс в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает pH лиофилизированного состава от около 5,0 до около 7,5. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает pH лиофилизированного состава от около 5,0 до около 6,5, например, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает pH лиофилизированного состава от около 6,0 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает pH лиофилизированного состава около 6. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает pH лиофилизированного состава около 6,2. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает pH лиофилизированного состава около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом

лиофилизированном составе поддерживает рН лиофилизированного состава от 5,0 до 7,5. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает рН лиофилизированного состава от 5,0 до 6,5, например, 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 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает рН лиофилизированного состава от 6,0 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает рН лиофилизированного состава в значении 6. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает рН лиофилизированного состава в значении 6,2. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе поддерживает рН лиофилизированного состава в значении 6,5.

В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 1 до около 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 5 до около 20 мМ, например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 10 мМ.

В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 1 до 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 5 до 20 мМ, например, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ или 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буферный агент в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 10 мМ.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 7,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 6,5, например, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав

имеет рН от около 6,0 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН около 6. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН около 6,2. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН от 5,0 до 7,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН от 5,0 до 6,5, например, 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 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН от 6,0 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН в значении 6. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН в значении 6,2. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав имеет рН в значении 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав дополнительно содержит регулятор осмотического давления и/или стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления регулятор осмотического давления и/или стабилизатор содержат сахарид. В данном контексте «сахарид» может представлять собой моносахарид, дисахарид, трисахарид, полисахарид, сахарный спирт или восстанавливающий сахар и невосстанавливающий сахар, например, глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, фруктозу, декстран, глицерин, эритрит, глицерин, арабит, ксилит, сорбит, маннит, мелибиозу, мелезитозу, рафинозу, маннотриозу, стахиозу, мальтозу, лактулозу, мальтулозу, сорбит, мальтит, лактит, изомальтулозу и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления регулятор осмотического давления и/или стабилизатор дополнительно содержат один или более из хлорида натрия, аргинин гидрохлорида, глицина и пролина. В некоторых вариантах осуществления регулятор осмотического давления и/или стабилизатор в вышеупомянутом лиофилизированном составе представляют собой дисахариды, такие как трегалоза или сахароза. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит трегалозу. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит трегалозу и один или более из хлорида натрия, аргинин гидрохлорида, глицина и пролина. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит сахарозу и один или более из хлорида натрия, аргинин гидрохлорида, глицина и пролина. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит трегалозу и хлорид натрия. В

некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит трегалозу и аргинин гидрохлорид. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит сахарозу и хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит сахарозу и аргинин гидрохлорид. В составе согласно настоящей заявке сахараиды включают сахараиды и/или их гидраты; например, трегалоза включает трегалозу и/или ее гидрат, такой как дигидрат трегалозы.

В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 150 до около 320 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около 180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 230 до около 240 мМ или от около 230 до около 235 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 233 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 234 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ, около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 232,6 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахараид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 233,7 мМ.

В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 150 до около 320 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около

180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 230 до около 240 мМ или от около 230 до около 235 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 233 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 180 до около 265 мМ, например, около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ, около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 232,6 мМ.

В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 10 до около 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 20 до около 200 мМ, например, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 150 мМ, около 160 мМ, около 170 мМ, около 180 мМ, около 190 мМ или около 200 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 50 до около 150 мМ, от около 100 до около 110 мМ или от около 100 до около 105 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 102,7 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 103 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутом лиофилизированном составе

присутствует в концентрации около 6 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления аргинин гидрохлорид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 100 мМ.

В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 10 до 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 20 до 200 мМ, например, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ, 105 мМ, 110 мМ, 115 мМ, 120 мМ, 125 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 145 мМ, 150 мМ, 160 мМ, 170 мМ, 180 мМ, 190 мМ или 200 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 50 до 150 мМ, от 100 до 110 мМ или от 100 до 105 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 102,7 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 103 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид натрия в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 6 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления аргинин гидрохлорид в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 100 мМ.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, которое может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80, полноксамера, тритона, додецилсульфоната натрия, лаурилсульфоната натрия, октилгликозида натрия, лаурилсульфобетаина, миристилсульфобетаина, линолеилсульфобетаина, стеарилсульфобетаина, лаурилсаркозина, миристилсаркозина, линолеилсаркозина, стеарилсаркозина, линолеилбетаина, миристилбетаина, цетилбетаина, лаурамидопропилбетаина, кокамидопропилбетаина, линолеамидопропилбетаина, миристамидопропилбетаина, пальмидопропилбетаина, изостеарамидопропилбетаина, миристамидопропилдиметиламина, палмидопропилдиметиламина, изостеарамидопропилдиметиламина, натрия метилкокоила, натрия метилолеилтаурата, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этилена и пропиленгликоля и т.п. Предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав

содержит полисорбат 80 (также известный как твин 80).

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 0,001 до около 0,1 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 0,005 до около 0,08 мас./об.%, например, около 0,005 мас./об.%, около 0,006 мас./об.%, около 0,007 мас./об.%, около 0,008 мас./об.%, около 0,009 мас./об.%, около 0,01 мас./об.%, около 0,015 мас./об.%, около 0,02 мас./об.%, около 0,025 мас./об.%, около 0,03 мас./об.%, около 0,035 мас./об.%, около 0,04 мас./об.%, около 0,045 мас./об.%, около 0,05 мас./об.%, около 0,06 мас./об.%, около 0,07 мас./об.% или около 0,08 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 0,01 до около 0,04 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации около 0,02 мас./об.%.

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от около 0,001 до около 0,1 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 0,005 до 0,08 мас./об.%, например, 0,005 мас./об.%, 0,006 мас./об.%, 0,007 мас./об.%, 0,008 мас./об.%, 0,009 мас./об.%, 0,01 мас./об.%, 0,015 мас./об.%, 0,02 мас./об.%, 0,025 мас./об.%, 0,03 мас./об.%, 0,035 мас./об.%, 0,04 мас./об.%, 0,045 мас./об.%, 0,05 мас./об.%, 0,06 мас./об.%, 0,07 мас./об.% или 0,08 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации от 0,01 до 0,04 мас./об.%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 в вышеупомянутом лиофилизированном составе присутствует в концентрации 0,02 мас./об.%.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буферного агента,

(c) от около 150 до около 320 мМ сахара; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от около 10 до около 300 мМ глицина и от около 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% поверхностно-активного вещества, где лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буферного агента,

(c) от около 150 до около 320 мМ трегалозы; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от 10 до около 300 мМ глицина и от 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80,

где лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буферного агента,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, от 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, от 20 до около 200 мМ глицина и от 20 до около 200 мМ пролина; и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80,

где лиофилизированный состав имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса (например, около 0,5 мг/мл, около 1 мг/мл, около 1,5 мг/мл, около 2 мг/мл, около 2,5 мг/мл, около 3 мг/мл, около 3,5 мг/мл, около 4 мг/мл, около 4,5 мг/мл, около 5 мг/мл, около 5,5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 6,5 мг/мл, около 7 мг/мл, около 7,5 мг/мл, около 8 мг/мл, около 8,5 мг/мл, около 9 мг/мл, около 9,5 мг/мл, около 10 мг/мл, около 11 мг/мл, около 12 мг/мл, около 13 мг/мл, около 14 мг/мл, около 15 мг/мл, около 16 мг/мл, около 17 мг/мл, около 18 мг/мл, около 19 мг/мл или около 20 мг/мл),

(b) от около 5 до около 20 мМ буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия (например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около 20 мМ),

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы (например, от около 180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ; или около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ, около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ); необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, от 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, от 20 до около 200 мМ глицина и от 20 до около 200 мМ пролина; и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 (например, около 0,005 мас./об.%, около 0,006 мас./об.%, около 0,007 мас./об.%, около 0,008 мас./об.%, около 0,009 мас./об.%, около 0,01 мас./об.%, около 0,015 мас./об.%, около 0,02 мас./об.%, около 0,025 мас./об.%, около 0,03 мас./об.%, около 0,035 мас./об.%, около 0,04 мас./об.%, около 0,045 мас./об.%, около 0,05 мас./об.%, около 0,06 мас./об.%, около 0,07 мас./об.% или около 0,08 мас./об.%),

где лиофилизированный состав имеет рН от около 6,0 до около 6,5 (например, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5).

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 мМ до около 30 мМ буферного агента (например, одного или более из буферного агента на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, буферного агента на основе янтарной кислоты и сукцината натрия и буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия),

(c) от около 150 до около 320 мМ сахара; и одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида,

от 10 до около 300 мМ глицина и от 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% поверхностно-активного вещества,

где лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса (например, около 0,5 мг/мл, около 1 мг/мл, около 1,5 мг/мл, около 2 мг/мл, около 2,5 мг/мл, около 3 мг/мл, около 3,5 мг/мл, около 4 мг/мл, около 4,5 мг/мл, около 5 мг/мл, около 5,5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 6,5 мг/мл, около 7 мг/мл, около 7,5 мг/мл, около 8 мг/мл, около 8,5 мг/мл, около 9 мг/мл, около 9,5 мг/мл, около 10 мг/мл, около 11 мг/мл, около 12 мг/мл, около 13 мг/мл, около 14 мг/мл, около 15 мг/мл, около 16 мг/мл, около 17 мг/мл, около 18 мг/мл, около 19 мг/мл или около 20 мг/мл),

(b) от около 5 до около 20 мМ буферного агента на основе гистидина и гидрохлорида гистидина (например, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ или около 20 мМ),

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы или сахарозы (например, около 180 мМ, около 185 мМ, около 198 мМ, около 211 мМ, около 214 мМ, около 217 мМ, около 219 мМ, около 222 мМ, около 225 мМ, около 227 мМ, около 230 мМ, около 233 мМ, около 235 мМ, около 238 мМ, около 241 мМ, около 243 мМ, около 246 мМ, около 248 мМ, около 251 мМ, 254 мМ, около 256 мМ, около 259 мМ, около 262 мМ или около 264 мМ; или около 180 мМ, около 185,02 мМ, около 198,24 мМ, около 211,46 мМ, около 214,1 мМ, около 216,74 мМ, около 219,39 мМ, около 222,03 мМ, около 224,67 мМ, около 227,31 мМ, около 229,96 мМ, около 232,6 мМ, около 235,24 мМ, около 237,89 мМ, около 240,53 мМ, около 243,17 мМ, около 245,82 мМ, около 248,46 мМ, около 251,1 мМ, 253,75 мМ, около 256,39 мМ, около 259,03 мМ, около 261,68 мМ или около 264,32 мМ) и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида (например, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 150 мМ, около 160 мМ, около 170 мМ, около 180 мМ, около 190 мМ или около 200 мМ), и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20

(например, около 0,005 мас./об.%, около 0,006 мас./об.%, около 0,007 мас./об.%, около 0,008 мас./об.%, около 0,009 мас./об.%, около 0,01 мас./об.%, около 0,015 мас./об.%, около 0,02 мас./об.%, около 0,025 мас./об.%, около 0,03 мас./об.%, около 0,035 мас./об.%, около 0,04 мас./об.%, около 0,045 мас./об.%, около 0,05 мас./об.%, около 0,06 мас./об.%, около 0,07 мас./об.% или около 0,08 мас./об.%),

где лиофилизированный состав имеет рН от около 6,0 до около 6,5 (например, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4 или около 6,5). В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(а) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ буферного агента на основе гистидина и гидрохлорида гистидин или буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(с) от около 150 до около 320 мМ трегалозы или сахарозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(а) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ буферного агента на основе гистидина и гидрохлорида гистидина или буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(с) от около 180 до около 265 мМ трегалозы или сахарозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где лиофилизированный состав имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(а) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(с) от около 150 до около 320 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(а) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(с) от около 180 до около 265 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где лиофилизированный состав имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(а) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буферного агента,

(с) от около 150 до около 320 мМ трегалозы и от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где лиофилизированный состав имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(а) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буферного агента,

(с) от около 180 до около 265 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где лиофилизированный состав имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный

состав содержит:

(a) от около 1 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буферного агента,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,01 до около 0,04 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где лиофилизированный состав имеет рН от около 6,0 до около 6,5.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 2 до около 3 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 10 мМ буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) около 233 мМ трегалозы, и

(d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,

где лиофилизированный состав имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) от около 2 до около 3 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 10 мМ буферного агента на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) около 232,6 мМ трегалозы, и

(d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,

где лиофилизированный состав имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) около 5 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 10 мМ цитратного буферного агента,

(c) около 233 мМ трегалозы и около 103 мМ хлорида натрия, и

(d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,

где лиофилизированный состав имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) около 5 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 10 мМ цитратного буферного агента,

(с) около 232,6 мМ трегалозы и около 102,7 мМ хлорида натрия, и

(d) около 0,02 мас./об.% полисорбата 80,

где лиофилизированный состав имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) около 2 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,

(с) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,

(d) около 0,233 ммоль трегалозы, и

(e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (с), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (с), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (с), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (с), (d) и (e),

где лиофилизированный состав имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) около 2 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,

(с) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,

(d) около 0,2326 ммоль трегалозы, и

(e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (с), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (с), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (с), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (с), (d) и (e),

где лиофилизированный состав имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) около 2 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 0,001 ммоль лимонной кислоты,

(с) около 0,009 ммоль цитрата натрия,

(d) около 0,23 ммоль трегалозы, и

(e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизированный состав имеет рН около 6,2.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) около 5 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,

(c) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,

(d) около 0,233 ммоль трегалозы и 6 мг хлорида натрия, и

(e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизированный состав имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

(a) около 5 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) около 0,0013 ммоль или около 0,0014 ммоль лимонной кислоты,

(c) около 0,0086 ммоль цитрата натрия,

(d) около 0,2326 ммоль трегалозы и 6 мг хлорида натрия, и

(e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизированный состав имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый лиофилизированный состав содержит:

- (a) около 5 мг биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,
- (b) около 0,001 ммоль лимонной кислоты,
- (c) около 0,009 ммоль цитрата натрия,
- (d) около 0,23 ммоль трегалозы и 6 мг хлорида натрия, и
- (e) около 0,2 мг полисорбата 80;

или содержит кратные количества (a), (b), (c), (d) и (e), например, целое кратное или дробное кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное или 4-кратное количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e), или целое кратное, равное более 5, количество каждого из компонентов (a), (b), (c), (d) и (e),

где лиофилизированный состав имеет рН около 6.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав стабилен при 2–8 °С в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав стабилен при 25 °С в течение по меньшей мере 1 месяца или по меньшей мере 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав стабилен при 40 °С в течение по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 14 дней или по меньшей мере 28 дней.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, которая представляет собой раствор, полученный путем восстановления вышеупомянутого лиофилизированного состава.

В настоящем изобретении также предложен способ получения вышеупомянутой фармацевтической композиции, который включает стадию восстановления вышеупомянутого лиофилизированного состава, причем раствор для восстановления включает, но не ограничивается, воду для инъекций, физиологический раствор или раствор глюкозы; вода для инъекций является предпочтительной.

В настоящем изобретении также предложено изделие, включающее контейнер, содержащий лиофилизированный состав или фармацевтическую композицию, полученную путем восстановления лиофилизированного состава, описанного в настоящем документе.

Ллиофилизированный состав или фармацевтическую композицию, полученную путем восстановления лиофилизированного состава, описанного в настоящем документе, можно вводить внутривенно (например, внутривенное капельное введение), внутримышечно, подкожно, парентерально, спинально или наочно (например, путем

инъекции или болюсной инъекции). Лиофилизированный состав или фармацевтическую композицию, полученную путем восстановления лиофилизированного состава, описанного в настоящем документе, можно разбавить подходящим разбавителем до подходящей концентрации перед введением для обеспечения наилучшего желаемого ответа (например, терапевтического ответа).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению лиофилизированного состава или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделия, описанного в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с CD20.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с CD20, представляет собой рак; предпочтительно рак выбран из группы, состоящей из, но не ограничивающейся, лимфомы, рака легкого, рака печени, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы, меланомы, глиобластомы, рака предстательной железы, рака пищевода и рака желудка.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с CD20, представляет собой В-клеточную лимфому, необязательно ходжкинскую лимфому или неходжкинскую лимфому, при этом неходжкинская лимфома включает: диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны (МЗЛ), лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (хронический лимфоцитарный лейкоз, ХЛЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) или макроглобулинемию Вальденстрема (WM).

В необязательных вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии содержит первую антигенсвязывающую часть, связанную со второй антигенсвязывающей частью, где:

первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий, от N-конца к С-концу, первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) Т-клеточного рецептора (TCR), и

второй полипептид, содержащий, от N-конца к С-концу, первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй

константной областью (C2) TCR,

где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C1 и C2, и указанная ненативная межцепочечная связь способна стабилизировать димер, и

вторая антигенсвязывающая часть содержит:

второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) второго антитела, функционально связанный с доменом CH1 тяжелой цепи антитела, и

второй переменный домен легкой цепи (VL2) второго антитела, функционально связанный с константным доменом легкой цепи (CL) антитела,

где одна из первой антигенсвязывающей части и второй антигенсвязывающей части представляет собой анти-CD3 связывающую часть, и другая из них представляет собой анти-CD20 связывающую часть;

указанная анти-CD3 связывающая часть получена из анти-CD3 антитела, содержащего:

a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 13,

b) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 14,

c) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 15,

d) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 16,

e) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 17, и

f) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 18,

указанная анти-CD20 связывающая часть получена из анти-CD20 антитела, содержащего:

a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 19,

b) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 20,

c) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 21,

d) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 22,

е) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11 и 23, и

ф) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 24.

В некоторых вариантах осуществления указанная анти-CD3 связывающая часть получена из анти-CD3 антитела, содержащего:

а) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

б) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14,

в) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15,

г) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16,

д) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и

е) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления указанная анти-CD20 связывающая часть получена из анти-CD20 антитела, содержащего:

а) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

б) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20,

в) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

г) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22,

д) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

е) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В необязательных вариантах осуществления анти-CD3 связывающая часть биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса в вышеупомянутой жидкой

композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии получена из анти-CD3 антитела, содержащего: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 27, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26 и 28. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающая часть получена из анти-CD3 антитела, содержащего: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 27, например, последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 27 с С-концевыми делециями аминокислот SS, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26 и 28. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающая часть получена из анти-CD3 антитела, содержащего: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающая часть получена из анти-CD3 антитела, содержащего: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, например, последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 с С-концевыми делециями аминокислот SS, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

В необязательных вариантах осуществления анти-CD20 связывающая часть биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса в вышеупомянутой жидкой композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии получена из анти-CD20 антитела, содержащего: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и 31, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 и 32. В некоторых

вариантах осуществления анти-CD20 связывающая часть получена из анти-CD20 антитела, содержащего: последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

В необязательных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть соединена с первым доменом димеризации, и вторая антигенсвязывающая часть соединена со вторым доменом димеризации, где указанные первый домен димеризации и второй домен димеризации связаны. В необязательных вариантах осуществления связывание достигается посредством линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика или гидрофобно-гидрофильного взаимодействия или их комбинации.

В необязательных вариантах осуществления первый домен димеризации и/или второй домен димеризации содержат по меньшей мере часть шарнирной области антитела, которая необязательно происходит из IgG1, IgG2 или IgG4.

В необязательных вариантах осуществления первый домен димеризации и/или второй домен димеризации содержат домен CH2 антитела и/или домен CH3 антитела.

В необязательных вариантах осуществления первый домен димеризации функционально связан с первой константной областью (C1) TCR в третьем соединительном домене.

В необязательных вариантах осуществления второй домен димеризации функционально связан с вариабельным доменом тяжелой цепи второй антигенсвязывающей части.

В необязательных вариантах осуществления первый домен димеризации и второй домен димеризации являются различными и связаны таким образом, который препятствует гомодимеризации и/или способствует гетеродимеризации.

В необязательных вариантах осуществления первый домен димеризации и второй домен димеризации могут быть связаны с образованием гетеродимера посредством принципа «выступы-во-впадины», гидрофобного взаимодействия, электростатического взаимодействия, гидрофильного взаимодействия или повышенной гибкости.

В необязательных вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии содержит комбинацию

следующих четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36.

В необязательных вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии содержит комбинацию следующих четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40.

В необязательных вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии содержит комбинацию следующих четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44.

В необязательных вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии содержит комбинацию следующих четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48.

В необязательных вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс в вышеупомянутой жидкой композиции, или лиофилизате, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизата, или лиофилизированном составе, или фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизированного состава, или изделии содержит комбинацию следующих четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52.

В необязательных вариантах осуществления одна или более аминокислот в положениях 193, 182, 203, 206 и 207 в полипептиде, представленном в SEQ ID NO: 44, модифицированы до любых аминокислот, отличных от серина и/или треонина, поэтому сайты гликозилирования элиминированы; предпочтительно аминокислота в положении 193 модифицирована. В необязательных вариантах осуществления аминокислота в

положении 193 в полипептиде, представленном в SEQ ID NO: 44, модифицирована до аланина, глицина, пролина или валина.

Вышеуказанные и другие признаки, а также преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания нескольких вариантов осуществления, которое продолжается со ссылкой на прилагаемые фигуры.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 представлена схема форматов исследуемых антител, где «E17R-1», «F16-1» и «F17R-1» схематически представляют собой форматы биспецифических антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP, W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP, соответственно, и «F18R-1» схематически представляет собой форматы биспецифических антител W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP. В контексте настоящего изобретения «U» в названиях биспецифических антител относится к анти-CD20 антителу или анти-CD20 связывающей части, и «T» в названиях биспецифических антител относится к анти-CD3 антителу или анти-CD3 связывающей части. Уникальная поверхность контакта легкой и тяжелой цепи, ортогональная по отношению к обычным антителам, разработана путем замены константных областей «T» (CL и CH1) константными доменами TCR. TCR-модифицированный «T» и нативный «U» используют в сочетании с мутациями по типу «выступ-во-впадину» в домене Fc для конструирования форматов биспецифических антител «E17R-1», «F16-1», «F17R-1» и «F18R-1».

На фиг. 2 показано связывание с мишенью, обнаруженное с помощью FACS (метод анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией): (A) анализ связывания биспецифического антитела по настоящему изобретению (WBP3278 BsAb) с клетками Jurkat и (B) анализ связывания биспецифического антитела по настоящему изобретению (WBP3278 BsAb) с клетками Raji.

На фиг. 3 показано одновременное связывание с двумя мишенями, обнаруженное с помощью FACS.

На фиг. 4 показано уничтожение T-клеток.

На фиг. 5A и 5B показана активация T-клеток, на которую указывает экспрессия CD25 и экспрессия CD69, соответственно.

На фиг. 6 показаны высвобождения IL-2 (A) и TNF- α (B) из CD4⁺ T-клеток.

На фиг. 7 показаны результаты стабильности сыворотки.

На фиг. 8 показана дозозависимая противоопухолевая активность BsAb по настоящему изобретению в модели терапевтического лечения *in vivo*.

На фиг. 9 показано истощение циркулирующих В-клеток в периферической крови после введения основного антитела (lead Ab) WBP3278 (то есть, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4) самцам яванских макак, первый раз используемого для иммунизации.

На фиг. 10А, 10В и 10С показаны изменения уровня циркулирующих Т-клеток в периферической крови после обработки основным антителом WBP3278.

На фиг. 11 показаны изменения уровней циркулирующих цитокинов после обработки основным антителом WBP3278.

На фиг. 12 показаны изменения концентрации основного антитела WBP3278 в сыворотке с течением времени.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следующее описание настоящего изобретения предназначено только для иллюстрации различных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Определения

«Буфер на основе соли гистидина» представляет собой буфер, содержащий ионы гистидина, или буфер, содержащий гистидин и/или соль гистидина, где гистидин включает гистидин и/или его гидрат, и соль гистидина включает соль гистидина и/или ее гидрат. Примеры буферов на основе соли гистидина включают такие буферы, как гистидин-гидрохлоридный, гистидин-ацетатный, гистидин-фосфатный, гистидин-сульфатный и гистидин-гистидин гидрохлоридный; предпочтительно буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина. Буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина относится к комбинации гистидина и гидрохлорида гистидина, где гистидин включает гистидин и/или его гидрат, и гидрохлорид гистидина включает гидрохлорид гистидина и/или его гидрат; в качестве примера, буфер на основе гистидина и гидрохлорида гистидина получают с гистидином и моногидратом гидрохлорида гистидина ($C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$).

«Сукцинатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы сукцината, или буфер, содержащий янтарную кислоту и/или соль сукцината, где янтарная кислота включает янтарную кислоту и/или ее гидрат, и соль сукцината включает соль сукцината и/или ее гидрат. Примеры сукцинатных буферов включают буфер на основе янтарной кислоты и сукцината натрия, янтарной кислоты и сукцината калия и янтарной кислоты и сукцинат кальция; предпочтительно сукцинатный буфер представляет собой буфер на основе янтарной кислоты и сукцината натрия. Буфер на основе янтарной кислоты и сукцината натрия относится к комбинации янтарной кислоты и сукцината натрия, где

янтарная кислота включает янтарную кислоту и/или ее гидрат, и сукцинат натрия включает сукцинат натрия и/или его гидрат.

«Цитратный буфер» представляет собой буфер, содержащий цитратные ионы, или буфер, содержащий лимонную кислоту и/или цитратную соль, где лимонная кислота включает лимонную кислоту и/или ее гидрат, и цитратная соль включает цитратную соль и/или ее гидрат. Примеры цитратных буферов включают буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия, лимонной кислоты и цитрата калия, лимонной кислоты и цитрата кальция и лимонной кислоты и цитрата магния; предпочтительно цитратный буфер представляет собой буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия. Буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия относится к комбинации лимонной кислоты и цитрата натрия, где лимонная кислота включает лимонную кислоту и/или ее гидрат, и цитрат натрия включает цитрат натрия и/или его гидрат; в качестве примера, буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия получают путем смешивания моногидрата лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) с дигидратом цитрата натрия ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$).

«Буфер» и «буферный агент» предназначены для целей поддержания pH композиции в диапазоне, приближенном к физиологическим условиям. Подходящие буферы/буферные агенты для настоящего изобретения включают неорганические кислоты в паре с их солями или органические кислоты в паре с их солями, например, цитратные буферы/буферные агенты (например, смесь лимонной кислоты и цитрата калия или смесь лимонной кислоты и цитрата натрия), сукцинатные буферы/буферные агенты (например, смесь янтарной кислоты и сукцината натрия или смесь янтарной кислоты и гидроксида натрия), буферы/буферные агенты на основе соли гистидина (например, смесь гистидина и гидрохлорида гистидина). В качестве примера, буфер/буферный агент на основе лимонной кислоты и цитрата натрия получают путем смешивания моногидрата лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) с дигидратом цитрата натрия ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$).

«Фармацевтическая композиция» и «состав» предназначены для охвата продуктов, содержащих указанный ингредиент (например, биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс), необязательно в определенном количестве, и любого продукта, который является прямым или косвенным результатом комбинации указанных ингредиентов, необязательно в определенных количествах. «Стабильные» или «стабилизированные» фармацевтические композиции или составы представляют собой те, в которых активный ингредиент (например, белок или антитело) по существу сохраняет свою физическую и/или химическую стабильность и/или биологическую активность во время хранения. Различные аналитические методы определения стабильности активного ингредиента известны в данной области техники, например, рассмотрены в Peptide and

Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). Стабильность может быть измерена при выбранных температурах и при других условиях хранения в течение выбранного периода времени. Например, активный ингредиент «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтической композиции, если он не демонстрирует значительного увеличения агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальном осмотре цвета и/или прозрачности, или при измерении с помощью рассеяния ультрафиолетового света, эксклюзионной хроматографии (SEC) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Предпочтительно, когда используется композиция по настоящему изобретению, 5 % или менее, 4 % или менее, предпочтительно 3 % или менее активного ингредиента образуют агрегаты, как измерено, например, с помощью SEC-HPLC (эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография) или любого другого подходящего способа измерения образования агрегатов. Активный ингредиент (например, белок или антитело) «сохраняет свою химическую стабильность» в фармацевтической композиции, если активный ингредиент (например, белок или антитело) не проявляет значительных химических изменений. Химическую стабильность можно оценить путем обнаружения и количественного определения химически измененных форматов белка или антитела. Процессы разложения, которые часто изменяют химическую структуру белка, включают гидролиз или усечение (оценивают такими методами, как эксклюзионная хроматография и ДСН-ПААГ-электрофорез (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия)), окисление (оценивают такими методами, как пептидное картирование в сочетании с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией)), дезамидирование (оценивают такими методами, как ионообменная хроматография, капиллярная изоэлектрическая фокусировка, пептидное картирование и измерение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризацию (оценивают путем измерения содержания изоаспарагиновой кислоты, путем пептидного картирования и т. д.). Активный ингредиент (например, белок или антитело) «сохраняет свою биологическую активность» в фармацевтической композиции в данный момент времени, например, как определено с помощью антигенсвязывающего анализа, если биологическая активность активного ингредиента (например, белка или антитела) в данный момент времени составляет по меньшей мере около 90 % (в пределах ошибки анализа) от таковой во время получения фармацевтической композиции. В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция или состав представляет собой водорастворимую инъекцию, включая, но не ограничиваясь, водорастворимую

композицию, не лиофилизированную, или водорастворимую композицию, полученную путем восстановления лиофилизированного порошка. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция или состав представляет собой лиофилизированный состав. Лиофилизированный состав относится к композиции, полученной путем лиофилизации водного раствора. Лиофилизация представляет собой процесс стабилизации, в котором вещество сначала замораживают, а затем количество растворителя уменьшают путем сублимации (процесс первичной сушки), а затем путем десорбции (процесс вторичной сушки) до тех пор, пока количество растворителя не уменьшается до значения, которое больше не поддерживает биологическую активность или химическую реакцию. Лиофилизированный состав по настоящему изобретению также может быть высушен другими способами, известными в данной области техники, такими как распылительная сушка и барботированная сушка.

Формы единственного числа используются в настоящем документе для обозначения одного или более (то есть, по меньшей мере одного) грамматических объектов статьи. Например, «композиция» относится к одной или более композициям.

Термин «около» или «приблизительно» означает, что числовое значение находится в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретного значения, определенного специалистами в данной области техники, и числовое значение частично зависит от того, как выполняется измерение или определение (то есть, пределы измерительной системы). Например, «около» или «приблизительно» в данной области техники может означать стандартное отклонение в пределах 1 или более 1. В альтернативном варианте «около» или «приблизительно» означает диапазон $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$. Кроме того, в частности, для биологической системы или процесса этот термин может означать не более чем на порядок или не более чем в 5 раз большее значение. В настоящем изобретении, если не указано иное, «около XX», или «приблизительно XX», или «по существу содержащее XX» означает числовое значение в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения «XX» (включая само числовое значение «XX»), а также те, которые находятся в пределах приемлемого диапазона погрешности для определения цифрового значения специалистами в данной области техники).

На протяжении всего настоящего изобретения, если из контекста не следует иное, слова «содержать/включать», «содержит/включает» и «содержащий/включающий» следует понимать как содержащие/включающие стадии или элементы или группу стадий или элементов, но не исключая любые другие стадии или элементы или группы стадий или элементов. «Состоящий из...» означает содержащий и ограниченный тем, что следует за фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из...» означает, что

перечисленные элементы являются требуемыми или необходимыми и что никакие другие элементы не могут присутствовать. «По существу состоящий из...» означает содержащий любой перечисленный элемент, который следует за указанной фразой, и ограниченный другими элементами, которые не мешают или которые являются благоприятными для активности или эффектов перечисленных элементов, как подробно описано в настоящем описании. Таким образом, фраза «по существу состоящий из...» означает, что перечисленные элементы являются требуемыми или необходимыми, но другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или отсутствовать в зависимости от того, влияют ли они на активность или эффекты перечисленных элементов.

«Один вариант осуществления», «вариант осуществления», «конкретный вариант осуществления», «связанный вариант осуществления», «определенный вариант осуществления», «другой вариант осуществления» или «дополнительный вариант осуществления», упомянутые в настоящем документе, или их комбинация, означает, что конкретные признаки, структуры или характеристики, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, выражение «вышеупомянутый/вышеуказанный», которое встречается во всем описании, не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, отдельные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления.

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к агрегату аминокислотных остатков или к совокупности множества агрегатов аминокислотных остатков. Эти термины применяются к аминокислотным агрегатам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственные химические имитации соответствующих встречающихся в природе аминокислот, и к встречающимся в природе аминокислотным агрегатам и не встречающимся в природе аминокислотным агрегатам. Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе аминокислотам и синтетическим аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным имитациям, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицируются, например, гидроксипролин, γ -карбоксихлутаминовая кислота и O-фосфосерин. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, имеющим ту же основную химическую структуру, что и встречающиеся в природе аминокислоты (т. е. те, в которых

α -углерод связан с водородом, карбоксильной, amino или R-группой), таким как гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид и метионин метилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Указанный α -углерод относится к первому атому углерода, присоединенному к функциональной группе (такой как карбонил). Указанный β -углерод относится ко второму атому углерода, присоединенному к α -углероду, и в этой системе атомы углерода непрерывно называются в греческом алфавитном порядке. Аминокислотные имитации относятся к химическим соединениям, структура которых отличается от общей химической структуры аминокислот, но которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Термин «белок» обычно относится к большому полипептиду. Термин «пептид» обычно относится к короткому полипептиду. В полипептидной последовательности левый конец обычно называют аминоконцом (N-концом), и правый конец называют карбоксиконцом (C-концом). «Полипептидный комплекс» в данном контексте относится к комплексу, содержащему один или более полипептидов, которые связаны с выполнением определенных функций. В некоторых вариантах осуществления полипептиды являются иммунологически значимыми.

Термин «антитело» в данном контексте охватывает любой иммуноглобулин, моноклональное антитело, поликлональное антитело, мультиспецифическое антитело или биспецифическое (двухвалентное) антитело, способное связываться с конкретным антигеном. Нативное интактное антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области («HCVR») и первой константной области, второй константной области и третьей константной области (CH1, CH2 и CH3, соответственно), и каждая легкая цепь состоит из переменной области («LCVR») и константной области (CL). Тяжелые цепи млекопитающих можно классифицировать на α , δ , ϵ , γ и μ , и легкие цепи млекопитающих можно классифицировать на λ или κ . Антитела имеют Y-образную форму, а стебель Y-образной структуры состоит из вторых константных областей и третьих константных областей двух тяжелых цепей, которые соединены дисульфидными связями. Каждое плечо Y-образной структуры содержит переменную область и первую константную область одной из тяжелых цепей, которые соединены с переменной областью и константной областью одной из легких цепей. Переменные области легкой цепи и тяжелой цепи отвечают за связывание антигена. Переменная область каждой цепи содержит три гиперпеременные петли, называемые определяющими комплементарность областями (CDR) (CDR легкой (L) цепи включают LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и CDR тяжелой (H) цепи включают HCDR1, HCDR2 и HCDR3).

Пределы CDR антитела могут быть названы или идентифицированы с использованием схемы Кабата, Чотиа или Аль-Лазикани (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5; 186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28; 342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Три CDR разделены фланкирующими непрерывными участками, называемыми каркасными областями (FR), которые более консервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки гипервариабельных петель. Каждая HCVR и LCVR содержит четыре FR, и CDR и FR расположены от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Константные области тяжелой цепи и легкой цепи не участвуют в связывании антигена, но имеют различные эффекторные функции. Антитела можно разделить на несколько классов на основе аминокислотных последовательностей константных областей тяжелой цепи. Антитела можно разделить на пять основных классов или изоформ на основе наличия тяжелых цепей α , δ , ϵ , γ и μ , и они представляют собой IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. Некоторые из основных классов антител также могут быть разделены на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь γ 1), IgG2 (тяжелая цепь γ 2), IgG3 (тяжелая цепь γ 3), IgG4 (тяжелая цепь γ 4), IgA1 (тяжелая цепь α 1) или IgA2 (тяжелая цепь α 2).

Термин «вариабельный домен», используемый в настоящем документе в отношении антитела, относится к вариабельной области антитела или ее фрагменту, содержащему одну или более CDR. Хотя вариабельный домен может содержать интактную вариабельную область (например, HCVR или LCVR), он также может содержать меньше чем интактную вариабельную область, но все же сохранять способность связываться с антигеном или образовывать антигенсвязывающий сайт.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающая часть» относится к фрагменту антитела, образованному из части антитела, содержащей один или более CDR, или любого другого фрагмента антитела, который связывается с антигеном, но не содержит интактную структуру антитела. Примеры антигенсвязывающих частей включают, но не ограничиваются, вариабельные домены, вариабельные области, диатела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагменты, дисульфид-стабилизированные Fv-фрагменты (dsFv), (dsFv)₂, биспецифические dsFv (dsFv-dsFv'), дисульфид-стабилизированные диатела (ds-диатела), мультиспецифические антитела, однодоменные верблюжки антитела, нанотела, доменные антитела и двухвалентные доменные антитела. Антигенсвязывающая часть может связываться с тем же антигеном, что и исходное антитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая часть может содержать одну или более

CDR из конкретного антитела человека, привитого к каркасной области от одного или более разных антител человека. Более подробные форматы антигенсвязывающих частей описаны в Spiess et al., 2015 (выше) и Brinkman et al., *mAbs*, 9(2), pp. 182–212 (2017), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

«Fab» антитела относится к части антитела, состоящей из легкой цепи (содержащей переменную область и константную область), соединенной с переменной областью и первой константной областью тяжелой цепи посредством дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления константные области как легкой цепи, так и тяжелой цепи заменены константными областями TCR.

«Fab'» относится к фрагменту Fab, который содержит часть шарнирной области.

«F(ab')₂» относится к димеру Fab.

««Трудный» фрагмент (Fd)» антитела относится к аминоконцевой половине фрагмента тяжелой цепи, которая может быть объединена с легкой цепью с образованием Fab.

«Fc» антитела относится к части антитела, состоящей из второй константной области (CH₂) и третьей константной области (CH₃) первой тяжелой цепи, соединенной со второй константной областью и третьей константной областью второй тяжелой цепи посредством дисульфидной связи. Fc-часть антитела отвечает за множество различных эффекторных функций, таких как ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность), но не участвует в связывании антигена.

«Шарнирная область» с точки зрения антитела содержит часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH₁ с доменом CH₂. Эта шарнирная область содержит около 25 аминокислотных остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо.

Термин «домен CH₂» в данном контексте относится к части молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, от приблизительно аминокислоты 244 до аминокислоты 360 антитела IgG, где аминокислоты пронумерованы с использованием обычных схем нумерации (аминокислоты 244-360, система нумерации Кабат; и аминокислоты 231-340, система нумерации EU; см. Kabat, E. et al., U.S. Department of Health and Human Services (1983)).

«Домен CH₃» простирается от домена CH₂ до C-конца молекулы IgG и содержит около 108 аминокислот. Некоторые классы иммуноглобулинов, такие как IgM, дополнительно содержат область CH₄.

«Fv» антитела относится к наименьшему фрагменту антитела, который содержит интактный антигенсвязывающий сайт. Fv-фрагмент состоит из переменной области

одной легкой цепи, соединенной с переменной областью одной тяжелой цепи. Предложено несколько конструкций Fv, включая dsFvs, в которых связь между двумя доменами усиливается введенной дисульфидной связью; и scFvs могут быть образованы путем образования одного полипептида путем соединения двух доменов вместе с помощью пептидного линкера. Получены конструкции Fv, содержащие переменный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, связанный с переменным доменом и константным доменом соответствующей тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина. Fv также были мультимеризованы с образованием диател и триател (Maynard et al., *Annu Rev Biomed Eng* 2 339-376 (2000)).

«ScFab» относится к слитому полипептиду, имеющему Fd, связанный с легкой цепью посредством полипептидного линкера, что приводит к одноцепочечному фрагменту Fab (scFab).

«TriFab» относится к трехвалентному биспецифическому слитому белку, состоящему из 3 единиц с функциями Fab. TriFab содержат два обычных Fab, слитых с асимметричной Fab-подобной частью.

«Fab-Fab» относится к слитому белку, образованному путем слияния цепи Fd первого плеча Fab с N-концом цепи Fd второго плеча Fab.

«Fab-Fv» относится к слитому белку, образованному путем слияния HCVR с C-концом цепи Fd и LCVR с C-концом легкой цепи. Молекулы «Fab-dsFv» могут быть образованы путем введения междоменной дисульфидной связи между доменом HCVR и доменом LCVR.

«MAb-Fv» или «IgG-Fv» относится к слитым белкам, образованным путем слияния домена HCVR с C-концом одной Fc-цепи и отдельной экспрессии домена LCVR или слияния его с C-концом другой Fc-цепи, и, таким образом, производится биспецифический трехвалентный слитый белок IgG-Fv (mAb-Fv), Fv которого стабилизируется междоменной дисульфидной связью.

«ScFab-Fc-scFv₂» и «ScFab-Fc-scFv» относятся к слитым белкам, образованным путем слияния одноцепочечного Fab с Fc и дисульфид-стабилизированным доменом Fv.

«Добавочный IgG» относится к слитому белку, в котором плечо Fab слито с IgG с образованием формата биспецифического (Fab)₂-Fc. Он может образовывать «IgG-Fab» или «Fab-IgG», в котором Fab слит с C-концом или N-концом молекулы IgG, независимо от того, присутствует линкер или нет. В некоторых вариантах осуществления добавочный IgG может быть дополнительно модифицирован до формата IgG-Fab₄ (см. Brinkman et al., 2017, выше).

«DVD-Ig» относится к антителу с двумя переменными доменами, которое

получают путем слияния дополнительного домена HCVR и домена LCVR второй специфичности с тяжелой цепью и легкой цепью IgG. «CODV-Ig» относится к родственному формату, в котором два домена HCVR и два домена LCVR связаны таким образом, что обеспечивает перекрестное спаривание переменных доменов HCVR-LCVR, которые расположены (от N-конца к C-концу) в порядке HCVR_A-HCVR_B и LCVR_B-LCVR_A или в порядке HCVR_B-HCVR_A и LCVR_A-LCVR_B.

«CrossMab» относится к методике спаривания немодифицированной легкой цепи с соответствующей немодифицированной тяжелой цепью и спаривания модифицированной легкой цепи с соответствующей модифицированной тяжелой цепью с получением антитела с уменьшенным неправильным спариванием в легкой цепи.

«BiTE» представляет собой биспецифическую привлекающую T-клетки молекулу, содержащую первый scFv с первой антигенной специфичностью в ориентации LCVR-HCVR, связанный со вторым scFv со второй антигенной специфичностью в ориентации HCVR-LCVR.

«WuXiBody» представляет собой биспецифическое антитело, содержащее растворимый химерный белок с переменными доменами антитела и константными доменами TCR, где субъединицы (например, α -домен и β -домен) константных доменов TCR связаны посредством сконструированной дисульфидной связи.

«Процент идентичности последовательности» в отношении аминокислотной последовательности (или нуклеотидной последовательности) относится к проценту аминокислотных (или нуклеотидных) остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным (или нуклеотидным) остаткам в референсной последовательности, при выравнивании последовательности, в которое при необходимости вводятся гэпы для достижения максимального количества аминокислот (или нуклеотидов). Консервативные замены аминокислотных остатков могут или не могут рассматриваться как идентичные остатки. Процент идентичности последовательностей для аминокислотной (или нуклеотидной) последовательности может быть определен путем осуществления выравнивания последовательностей с использованием инструментов, раскрытых в данной области техники, таких как BLASTN, BLASTp (Национальный центр биотехнологической информации США (NCBI), см. также Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990); Stephen F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997)), ClustalW2 (доступен на веб-сайте Европейского института биоинформатики, см. также Higgins D.G. et al, *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21): 2947-8 (2007)), и программное обеспечение ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники

могут использовать параметры по умолчанию, обеспечиваемые инструментами, или могут соответствующим образом регулировать параметры, необходимые для выравнивания, например, путем выбора подходящего алгоритма.

«Антиген» или «Ag» в данном контексте относится к соединению, композиции, пептиду, полипептиду, белку или веществу, которое может стимулировать выработку антител или Т-клеточные ответы в культуре клеток или у животного, включая композиции (например, содержащие специфические для рака белки), которые добавляют в культуру клеток (например, гибридому) или инъецируют животному или всасываются животным. Антиген реагирует с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета (например, антителом, включая продукты, индуцированные гетерологичными антигенами).

«Эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к области антигена, с которой связывается связывающий агент (например, антитело). Эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот (также известных как линейные или последовательные эпитопы) или несмежных аминокислот, сопряженных с третичной укладкой белка (также известных как конфигурационные или конформационные эпитопы). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно расположены линейно вдоль первичных аминокислотных остатков на белке, и небольшие сегменты смежных аминокислот могут расщепляться путем связывания антигенов с молекулами основного комплекса гистосовместимости (МНС) или сохраняться при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитопы обычно содержат по меньшей мере 3, более типично по меньшей мере 5, около 7 или около 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

«Специфическое связывание» или «специфически связываются с», как используется в настоящем документе, относится к неслучайной реакции связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном. В некоторых вариантах осуществления предложен биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, который специфически связывается с антигеном с аффинностью связывания (K_D) меньше или равно 10^{-6} М (например, меньше или равно 5×10^{-7} М, меньше или равно 2×10^{-7} М, меньше или равно 10^{-7} М, меньше или равно 5×10^{-8} М, меньше или равно 2×10^{-8} М, меньше или равно 10^{-8} М, меньше или равно 5×10^{-9} М, меньше или равно 2×10^{-9} М, меньше или равно 10^{-9} М или меньше или равно 10^{-10} М). K_D в данном контексте относится к отношению скорости диссоциации к скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}), которое может быть определено с использованием способа поверхностного плазмонного

резонанса, например, с использованием инструмента, такого как Biacore.

Термин «функциональная связь» или «функционально связанный» относится к сопоставлению двух или более представляющих интерес биологических последовательностей таким образом, что они находятся в отношениях, позволяющих им функционировать предусмотренным образом, независимо от наличия спейсера или линкера. При использовании в отношении полипептидов термин предназначен для обозначения того, что полипептидные последовательности связаны таким образом, что продукт связывания имеет предполагаемую биологическую функцию. Например, переменная область антитела может быть функционально связана с константной областью с образованием стабильного продукта с антигенсвязывающей активностью. Термин также может быть использован в отношении полинуклеотидов. Например, когда полинуклеотид, кодирующий полипептид, функционально связан с регуляторной последовательностью (например, последовательностью промотора, последовательностью энхансера или подавляющей последовательностью), этот термин означает, что полинуклеотидная последовательность связана таким образом, что обеспечивает регулируемую экспрессию полипептида полинуклеотидом.

Термин «слияние» или «слитый» при использовании в отношении аминокислотных последовательностей (например, пептидов, полипептидов или белков) относится к комбинации двух или более аминокислотных последовательностей в не встречающуюся в природе одиночную аминокислотную последовательность, например, путем химического связывания или рекомбинантными способами. Слитая аминокислотная последовательность может быть получена путем рекомбинации двух генов, кодирующих полинуклеотидные последовательности, и может быть экспрессирована путем введения конструкции, содержащей рекомбинантный полинуклеотид, в клетку-хозяина.

Термин «спейсер» в данном контексте относится к искусственной аминокислотной последовательности из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков или от 5 до 15, 20, 30, 50 или более аминокислотных остатков, которые связаны пептидными связями и используются для связывания одного или более полипептидов. Спейсер может иметь или не иметь вторичную структуру. Спейсерные последовательности хорошо известны в данной области техники, см., например, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); и Poljak et al., Structure 2:1121-1123 (1994). Может быть использован любой подходящий спейсер, известный в данной области техники.

Термин «антигенная специфичность» относится к конкретному антигену или его эпитопу, который селективно распознается антигенсвязывающей молекулой.

Термин «замена», используемый в настоящем документе в отношении

аминокислотных остатков, относится к замене одной или более встречающихся в природе или введенных аминокислот другой в пептиде, полипептиде или белке. Замены в полипептиде могут приводить к уменьшению, усилению или устранению функции полипептида.

Замена также может представлять собой «консервативную замену», которая при использовании в отношении аминокислотной последовательности относится к замене одного аминокислотного остатка другим, имеющим боковую цепь с аналогичными физико-химическими свойствами, или к замене тех аминокислот, которые не являются критическими для активности полипептида. Например, консервативные замены могут быть сделаны между аминокислотными остатками неполярной боковой цепи (например, Met, Ala, Val, Leu и Ile, Pro, Phe и Trp), между незаряженными остатками полярной боковой цепи (например, Cys, Ser, Thr, Asn, Gly и Gln), между кислотными остатками боковой цепи (например, Asp и Glu), между аминокислотами основной боковой цепи (например, His, Lys и Arg), между аминокислотами β -разветвленной боковой цепи (например, Thr, Val и Ile), между серосодержащими аминокислотами боковой цепи (например, Cys и Met) или между ароматическими остатками боковой цепи (например, Trp, Tyr, His и Phe). В некоторых вариантах осуществления замена, делеция или добавление также могут считаться «консервативной заменой». Количество вставленных или удаленных аминокислот может составлять приблизительно от 1 до 5. Консервативные замены обычно не вызывают значительных изменений в конформационной структуре белка, и, следовательно, биологическая активность белка может быть сохранена.

Термин «мутация» или «мутированный», как используется в настоящем документе для аминокислотного остатка, относится к замене, вставке или добавлению аминокислотного остатка.

Термин «Т-клетки», как используется в настоящем документе, относится к классу лимфоцитов, которые играют критическую роль в клеточно-опосредованном иммунитете, включая хелперные Т-клетки (например, CD4⁺ Т-клетки, Т-хелперные Т-клетки типа 1, Т-хелперные Т-клетки типа 2, Т-хелперные Т-клетки типа 3 и Т-хелперные Т-клетки типа 17), цитотоксические Т-клетки (например, CD8⁺ Т-клетки), Т-клетки памяти (например, центральные Т-клетки памяти (ТСМ-клетки), эффекторные Т-клетки памяти (ТЕМ-клетки и TEMRA-клетки) и резидентные Т-клетки памяти (TRM), которые представляют собой CD8⁺ или CD4⁺), естественные киллерные Т-клетки (НКТ) и супрессорные Т-клетки.

Нативный «Т-клеточный рецептор» или нативный «TCR» представляет собой гетеродимерный белок поверхности Т-клеток, который связывается с инвариантной цепью CD3 с образованием комплекса, способного опосредовать передачу сигнала. TCR является

членом суперсемейства иммуноглобулинов и аналогичен полуантителу с одной тяжелой цепью и одной легкой цепью. Нативный TCR имеет внеклеточную часть, трансмембранную часть и внутриклеточную часть. Внеклеточный домен TCR имеет мембрано-проксимальную константную область и мембрано-дистальную переменную область.

В данном контексте термин «субъект», или «индивидуум», или «животное», или «пациент» относится к человеку или животному, не являющемуся человеком, включая млекопитающих или приматов, нуждающемуся в диагностике, прогнозировании, улучшении, предотвращении и/или лечении заболевания или расстройства. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, принимающих участие в спорте, или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, свиньи, крупный рогатый скот и медведи.

«Лечение» или «терапия» включает предотвращение или облегчение определенного состояния, снижение скорости, с которой возникает или развивается определенное состояние, снижение риска развития определенного состояния, предотвращение или задержку развития симптомов, связанных с определенным состоянием, уменьшение или прекращение симптомов, связанных с определенным состоянием, достижение полного или частичного устранения определенного состояния, излечение определенного состояния или их комбинацию. Что касается рака, «лечение» или «терапия» могут относиться к ингибированию или замедлению роста, пролиферации или метастазирования опухолевых или злокачественных клеток, предотвращению или задержке развития роста, пролиферации или метастазирования опухолевых или злокачественных клеток или некоторым их комбинациям. Что касается опухоли, «лечение» или «терапия» включает удаление всей или части опухоли, ингибирование или замедление роста и метастазирования опухоли, предотвращение или задержку развития опухоли или некоторые их комбинации.

Биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс

Термин «биспецифический» в данном контексте означает, что существуют две антигенсвязывающие части, каждая из которых способна специфически связываться с различным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в настоящем документе, содержит первую антигенсвязывающую часть, связанную со второй антигенсвязывающей частью, и одна из них специфически связывается с CD3, а другая из них специфически связывается с CD20. Другими словами, первая антигенсвязывающая

часть может специфически связываться с CD3, а вторая антигенсвязывающая часть может специфически связываться с CD20. В альтернативном варианте первая антигенсвязывающая часть может специфически связываться с CD20, а вторая антигенсвязывающая часть может специфически связываться с CD3. В настоящем изобретении термины «биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс» используются взаимозаменяемо с терминами «полипептидный комплекс, нацеленный на CD3 и CD20», или «полипептидный комплекс к CD3 и CD20» или «биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс».

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, содержащий первую антигенсвязывающую часть, связанную со второй антигенсвязывающей частью, где:

первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий, от N-конца к С-концу, первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) Т-клеточного рецептора (TCR), и

второй полипептид, содержащий, от N-конца к С-концу, первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR,

где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C1 и C2, и указанная ненативная межцепочечная связь способна стабилизировать димер, и

вторая антигенсвязывающая часть содержит:

второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) второго антитела, функционально связанный с доменом CH1 тяжелой цепи антитела, и

второй переменный домен легкой цепи (VL2) второго антитела, функционально связанный с константным доменом легкой цепи (CL) антитела,

где одна из первой антигенсвязывающей части и второй антигенсвязывающей части представляет собой анти-CD3 связывающую часть, а другая из них представляет собой анти-CD20 связывающую часть;

указанная анти-CD3 связывающая часть получена из анти-CD3 антитела, содержащего:

a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 13,

b) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 14,

c) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 15,

d) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 16,

e) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 17, и

f) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 18,

указанная анти-CD20 связывающая часть получена из анти-CD20 антитела, содержащего:

a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 19,

b) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 20,

c) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 21,

d) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 22,

e) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11 и 23, и

f) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 24.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в данном документе, содержит первую антигенсвязывающую часть, содержащую последовательность, полученную из константной области TCR, но вторая антигенсвязывающая часть не содержит последовательность, полученную из константной области TCR.

Биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в настоящем документе, значительно реже имеет неправильно спаренные переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что стабильные константные области TCR в первой антигенсвязывающей части могут быть специфически связаны друг с другом и, таким образом, способствуют высокоспецифическому спариванию целевых VH1 и VL1, препятствуя нежелательному неправильному спариванию VH1 или VL1 с другими переменными областями, которые не обеспечивают сайт связывания целевого антигена.

В некоторых вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая часть дополнительно содержит константный домен CH1 антитела, функционально связанный с VH2, и константный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с VL2. Таким образом, вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab.

Когда первый, второй, третий и четвертый переменные домены (например, VH1, VH2, VL1 и VL2) экспрессируются в одной клетке, крайне желательно, чтобы VH1 специфически спаривался с VL1 и VH2 с VL2, так чтобы полученный биспецифический белковый продукт обладал правильной антигенсвязывающей специфичностью. Однако в предшествующем уровне техники, таком как гибрид-гибридома (или квадрома), происходит случайное спаривание VH1, VH2, VL1 и VL2, что приводит к образованию до 10 различных молекул, только одна из которых представляет собой функциональную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Это не только снижает выход, но также усложняет очистку целевого продукта.

Биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в настоящем документе, является исключительным в том смысле, что переменные домены с меньшей вероятностью будут неправильно спарены, по сравнению со случаем, когда первая антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть являются аналогами нативных Fab. В иллюстративном примере первый антигенсвязывающий домен содержит VH1-C1 в паре с VL1-C2, а второй антигенсвязывающий домен содержит VH2-CH1 в паре с VL2-CL. Неожиданно было обнаружено, что C1 и C2 предпочтительно связываются друг с другом и с меньшей вероятностью связываются с CL или CH1, таким образом, образование нежелательных пар, таких как C1-CH, C1-CL, C2-CH и C2-CL, затрудняется и значительно снижается. В результате специфического связывания C1-C2 VH1 специфически спаривается с VL1 и тем самым образует первый антигенсвязывающий сайт, а CH1 специфически спаривается с CL, тем самым обеспечивая специфическое спаривание VH2-VL2, что обеспечивает второй антигенсвязывающий сайт. Соответственно, первая антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть с меньшей вероятностью будут неправильно спарены, и неправильное спаривание между, например, VH1-VL2, VH2-VL1, VH1-VH2 и VL1-VL2 значительно снижено по сравнению со случаем, когда первая антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть являются аналогами нативных Fab (например, в форме VH1-CH1, VL1-CL, VH2-CH1 и VL2-CL).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в настоящем документе, имеет значительно меньше продуктов неправильного спаривания (например, снижение по меньшей мере на 1,

2, 3, 4, 5 или более продуктов неправильного спаривания) и/или значительно более высокий выход (например, увеличение выхода по меньшей мере на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % или более) при экспрессии из клетки по сравнению с референсной молекулой, экспрессируемой в сопоставимых условиях, где референсная молекула идентична биспецифическому анти-CD3/CD20 полипептидному комплексу, за исключением того, что C1 замещен нативным CH1 и C2 замещен нативным CL.

Антигенсвязывающая часть, содержащая сконструированные C α и C β

Первая антигенсвязывающая часть, предложенная в настоящем документе, содержит первый переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с первой константной областью T-клеточного рецептора (TCR), и первый переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный со второй константной областью TCR, причем первая константная область TCR и вторая константная область TCR связаны посредством по меньшей мере одной ненативной межцепочечной дисульфидной связи. Первая антигенсвязывающая часть содержит по меньшей мере две полипептидные цепи, каждая из которых содержит переменный домен, полученный из антитела, и константную область, полученную из TCR. Таким образом, первая антигенсвязывающая часть содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, каждый из которых функционально связан с парой константных областей TCR. В некоторых вариантах осуществления пара константных областей TCR в первой антигенсвязывающей части представляет собой константные области α/β TCR. Константные области TCR биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса, предложенного в настоящем документе, могут связываться друг с другом с образованием димера посредством по меньшей мере одной ненативной дисульфидной связи.

Неожиданно было обнаружено, что первая антигенсвязывающая часть с по меньшей мере одной ненативной дисульфидной связью, предложенной в настоящем документе, может быть рекомбинантно экспрессирована и собрана в желаемую конформацию, которая стабилизирует димер константной области TCR и обеспечивает хорошую антигенсвязывающую активность переменных областей антитела. Кроме того, обнаружено, что первая антигенсвязывающая часть хорошо переносит рутинное конструирование антител, например, модификацию сайтов гликозилирования и удаление некоторых природных последовательностей. Кроме того, биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в настоящем документе, может быть включен в биспецифический формат, который может быть легко экспрессирован и собран с минимальным или практически отсутствующим неправильным спариванием антигенсвязывающих последовательностей из-за присутствия константных областей TCR

в первой антигенсвязывающей части. Другие преимущества первой антигенсвязывающей части и конструкции, предложенных в настоящем документе, будут более очевидны в описании ниже.

Таким образом, в настоящем изобретении предложена первая антигенсвязывающая часть, содержащая первый полипептид и второй полипептид, причем первый полипептид содержит, от N-конца к С-концу, первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) Т-клеточного рецептора (TCR), а второй полипептид содержит, от N-конца к С-концу, первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, где C1 и C2 могут образовывать димер, а ненативная межцепочечная дисульфидная связь между C1 и C2 способна стабилизировать указанный димер.

Константная область TCR

Первая антигенсвязывающая часть, описанная в настоящем документе, содержит константную область α или β , полученную из TCR.

Константная область α -цепи TCR человека известна как TRAC под номером доступа NCBI P01848.

Существует два различных варианта константной области β -цепи TCR человека, известные как TRBC1 и TRBC2 (номенклатура IMGT) (Toyonaga B et al., PNAS, Vol. 82, pp.8624-8628, Immunology (1985)).

В настоящем изобретении первая константная область TCR и вторая константная область TCR первой антигенсвязывающей части, предложенные в настоящем документе, могут образовывать димер, который содержит между константными областями TCR по меньшей мере одну ненативную межцепочечную дисульфидную связь, способную стабилизировать димер.

Термин «димер» в данном контексте относится к структуре двух молекул (например, полипептидов или белков), которые связаны посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий. Гомодимер или гомодимеризация образованы из двух идентичных молекул, в то время как гетеродимер или гетеродимеризация образованы из двух различных молекул. Димер, образованный из первой константной области TCR и второй константной области TCR, представляет собой гетеродимер.

«Мутированный» аминокислотный остаток относится к замещенному, вставленному или добавленному аминокислотному остатку, который отличается от соответствующего нативного остатка в соответствующей нативной константной области TCR. Например, если аминокислотный остаток в определенном положении в константной

области TCR дикого типа называют «нативным» остатком, его соответствующий мутированный остаток представляет собой любой остаток, который отличается от нативного остатка, но находится в том же положении на константной области TCR. Мутированный остаток может представлять собой другой остаток, который заменяет нативный остаток в том же положении или который вставляется перед нативным остатком и, следовательно, занимает исходное место нативного остатка.

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в настоящем документе, первая константная область TCR и/или вторая константная область TCR были сконструированы таким образом, чтобы содержать один или более мутированных аминокислотных остатков, ответственных за образование ненативной межцепочечной дисульфидной связи. Для введения такого мутированного остатка в константную область TCR можно манипулировать кодирующей последовательностью области TCR, например, для замены кодона, кодирующего нативный остаток, кодоном, кодирующим мутированный остаток, или для вставки кодона, кодирующего мутированный остаток, перед кодоном нативного остатка.

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в настоящем документе, первая константная область TCR и/или вторая константная область TCR были сконструированы таким образом, чтобы содержать один или более мутированных остатков цистеина, так что при замене остатков цистеина между двумя константными областями TCR может быть образована ненативная межцепочечная дисульфидная связь.

Ненативная межцепочечная дисульфидная связь способна стабилизировать первую антигенсвязывающую часть. Такие эффекты при стабилизации могут быть воплощены различными способами. Например, присутствие мутированных аминокислотных остатков или ненативной межцепочечной дисульфидной связи может позволить биспецифическому анти-CD3/CD20 полипептидному комплексу стабильно экспрессироваться, и/или экспрессироваться на высоких уровнях, и/или быть связанным в стабильный комплекс с желаемой биологической активностью (например, антигенсвязывающей активностью), и/или экспрессироваться и собираться в желаемый стабильный комплекс высокого уровня с желаемой биологической активностью. Способность межцепочечной дисульфидной связи стабилизировать первую константную область TCR и вторую константную область TCR можно оценить с помощью подходящих способов, известных в данной области техники (таких как отображение молекулярной массы на ДСН-ПААГ-электрофорезе или определение термостабильности с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) или дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ)). В

иллюстративном примере образование стабильной первой антигенсвязывающей части, предложенной в настоящем документе, может быть подтверждено с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, если продукт демонстрирует молекулярную массу, сопоставимую с объединенной молекулярной массой первого полипептида и второго полипептида. В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть, описанная в настоящем документе, является стабильной в том смысле, что ее термостабильность составляет не менее 50 %, 60 %, 70 %, 80 % или 90 % от термостабильности нативного Fab. В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть, описанная в настоящем документе, является стабильной в том смысле, что ее термостабильность может сравниваться с термостабильностью нативного Fab.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что ненативная межцепочечная дисульфидная связь, образованная между первой константной областью TCR и второй константной областью TCR в первой антигенсвязывающей части, способна стабилизировать гетеродимер константных областей TCR, тем самым повышая уровень правильной укладки, структурную стабильность и/или уровень экспрессии гетеродимера и первой антигенсвязывающей части. В отличие от нативного TCR, закрепленного на клеточной мембране поверхности Т-клетки, гетеродимеры внеклеточного домена нативного TCR являются менее стабильными, хотя они аналогичны по трехмерной структуре антителу Fab. В действительности, нестабильность растворенного нативного TCR раньше была значительным препятствием, которое затрудняло выяснение его кристаллической структуры (см. Wang, Protein Cell, 5(9), pp.649-652 (2014)). Вводя пару мутаций цистеина (Cys) в константные области TCR и тем самым обеспечивая образование межцепочечной ненативной дисульфидной связи, первая антигенсвязывающая часть может быть стабильно экспрессирована с сохранением антигенсвязывающей способности варибельной области антитела.

Константные области TCR, содержащие мутированные остатки, также упоминаются в настоящем документе как «сконструированные» константные области TCR. В некоторых вариантах осуществления первая константная область (C1) TCR биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса содержит сконструированную α -цепь TCR (C α), а вторая константная область (C2) TCR содержит сконструированную β -цепь TCR (C β). В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, представленном в настоящем документе, C1 содержит сконструированную C β , а C2 содержит сконструированную C α .

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в

настоящем документе, сконструированные константные области TCR содержат один или более мутированных остатков цистеина, содержащихся в поверхности контакта первой сконструированной константной области и/или второй сконструированной константной области.

Термин «поверхность контакта» в данном контексте относится к конкретной области на полипептидах, где полипептиды взаимодействуют/связываются друг с другом. Поверхность контакта содержит один или более аминокислотных остатков, которые способны взаимодействовать с соответствующими аминокислотными остатками при контакте или связывании, когда происходит взаимодействие. Аминокислотные остатки в поверхности контакта могут находиться или не находиться в непрерывной последовательности. Например, когда поверхность контакта является трехмерной, аминокислотные остатки в пределах поверхности контакта могут быть разделены в различных положениях на линейной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления между сконструированной C α и сконструированной C β могут быть образованы одна или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления спаривание остатков цистеина может образовывать ненативную межцепочечную дисульфидную связь.

В контексте настоящего изобретения «XnY» в отношении константной области TCR означает, что n-й аминокислотный остаток X на константной области TCR замещен аминокислотным остатком Y, где X и Y представляют собой однобуквенные сокращения для конкретных аминокислотных остатков.

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в настоящем документе, сконструированная C β содержит или представляет собой SEQ ID NO: 61, и сконструированная C α содержит или представляет собой SEQ ID NO: 62.

Последовательности SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 представлены ниже:

LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHS
GVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR
AKPVTQIVSAEA (SEQ ID NO: 61)

PDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRS
MDFKSNSAWAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPPESS (SEQ ID NO: 62)

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в настоящем документе, один или более нативных сайтов гликозилирования, присутствующих в нативных константных областях TCR, могут быть модифицированы (например, удалены) в первой антигенсвязывающей части, предложенной в настоящем документе. Термин «сайт гликозилирования», используемый в настоящем документе в

отношении полипептидной последовательности, относится к аминокислотному остатку с боковой цепью, к которой может быть присоединена углеводная часть (например, олигосахаридная структура). Гликозилирование полипептидов (таких как антитела) обычно является N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводной части к боковой цепи остатка аспарагина, например, остатка аспарагина в трипептидной последовательности, такой как аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикаминокислоте, чаще всего к серину или треонину. Удаление нативных сайтов гликозилирования может быть надлежащим образом осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что одна или более из трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования), описанных выше, или один или более из остатков серина или треонина (для O-связанных сайтов гликозилирования), присутствующих в последовательности, являются замещенными.

В первой антигенсвязывающей части, предложенной в настоящем документе, по меньшей мере один нативный сайт гликозилирования отсутствует в сконструированных константных областях TCR (например, в первой константной области TCR и/или второй константной области TCR). Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что первая антигенсвязывающая часть, описанная в настоящем документе, может переносить удаление всех или некоторых сайтов гликозилирования, не влияя на экспрессию и стабильность белка, в отличие от существующего представления о том, что присутствие N-связанного сайта гликозилирования на константной области TCR, такой как C α (т.е. N34, N68 и N79) и C β (т.е. N69), необходимо для экспрессии и стабильности белка (см. Wu et al., *Mabs*, 7:2, 364-376, 2015).

В первой антигенсвязывающей части, предложенной в настоящем документе, константная область, полученная из TCR, функционально связана с переменной областью, полученной из антитела.

В некоторых вариантах осуществления первый переменный домен антитела (VH) слит с первой константной областью (C1) TCR на первом соединительном домене, и первый переменный домен (VL) антитела слит со второй константной областью (C2) TCR на втором соединительном домене.

Термин «соединительный домен» в контексте настоящего документа относится к границе или пограничной области, в которой две аминокислотные последовательности слиты или объединены. В некоторых вариантах осуществления первый соединительный

домен содержит по меньшей мере часть С-концевого фрагмента V/C-соединения антитела, а второй соединительный домен содержит по меньшей мере часть N-концевого фрагмента V/C-соединения TCR.

Термин «V/C-соединение антитела» в данном контексте относится к соединению переменного домена антитела и константного домена, например, соединению переменного домена тяжелой цепи и домена CH1 или соединению переменного домена легкой цепи и константного домена легкой цепи. Аналогичным образом, термин «V/C-соединение TCR» относится к соединению переменного домена TCR и константного домена, например, соединению переменного домена TCR α и константного домена или соединению переменного домена TCR β и константного домена.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит последовательность, содержащую домен, функционально связанный с формулой (I): VH-HCJ-C1, а второй полипептид содержит последовательность, содержащую домен, функционально связанный с формулой (II): VL-LCJ-C2, где:

VH представляет собой переменный домен тяжелой цепи антитела; HCJ представляет собой первый связывающий домен, как определено выше; C1 представляет собой первый константный домен TCR, как определено выше; VL представляет собой переменный домен легкой цепи антитела; LCJ представляет собой второй соединительный домен, как определено выше; C2 представляет собой второй константный домен TCR, как определено выше.

Переменная область антитела

Биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в настоящем документе, содержит первую антигенсвязывающую часть, связанную со второй антигенсвязывающей частью, и одна из них специфически связывается с CD3, а другая из них специфически связывается с CD20. В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, представленном в настоящем документе, первая антигенсвязывающая часть содержит первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1) первого антитела, и вторая антигенсвязывающая часть содержит второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2) второго антитела, причем первое антитело и второе антитело являются различными и выбраны из группы, состоящей из анти-CD3 антитела и анти-CD20 антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело представляет собой анти-CD3 антитело, и второе антитело представляет собой анти-CD20 антитело. В некоторых других вариантах осуществления первое антитело представляет собой анти-CD20 антитело, и второе антитело представляет собой анти-CD3 антитело.

В обычном нативном антителе переменная область содержит три CDR, разделенные фланкирующими каркасными областями (FR), например, как указано в следующей формуле: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, от N-конца к С-концу.

а) Анти-CD3 связывающая часть

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в настоящем документе, первая антигенсвязывающая часть или вторая антигенсвязывающая часть представляет собой анти-CD3 связывающую часть.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающая часть получена из антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP, которые показаны в таблице А ниже. Последовательности CDR анти-CD3 связывающей части антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Таблица А

Идентификационный номер антитела:		CDR1	CDR2	CDR3
W3278-T2U3.E17R-1. uIgG4.SP,	VH	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
		GYSFTTYIHH	WIFPGNDNIKYS EKFKG	DSVSIYYFDY
W3278-U3T2.F18R-1. uIgG4.SP	Vκ	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		KSSQSLLSRTR KNYLA	WASTRKS	TQSFILRT

Последовательности переменной области тяжелой цепи и κ-легкой цепи анти-CD3 связывающих частей антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO: 25):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYSFTTYIHWVRQAPGQGLEWMGWIFP
GNDNIKYSKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIDSVSIYYFDYWGQGT
LVTVSS

Нуклеотидная последовательность VH (SEQ ID NO: 53):

cagggtgcaactcgtgcagctcggagctgaagtgaagaagcctgggtcttcagtcagggtcagttgcaaggccagtggtattcc
ttcactacactacatccactgggtgcggcaggcaccaggacaggggcttgagtggtgggtggtatcttcccggaacgataatattaa
gtacagcgagaagttcaaggagggtcaccattaccgccgacaatccactccacagcctacatggagttgagcagcctgagatccga
ggatacagccgtgtactactgtgccattgacagcgtgtccatctactactttgactactggggccagggcacactggtcacagtgagcagc

Аминокислотная последовательность Vκ (SEQ ID NO: 26):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLLIY
WASTRKSQVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCTQSFILRTFGGGTKVEIK

Нуклеотидная последовательность V_κ (SEQ ID NO: 54):

gacatcgtcatgacccagtcctccagactctttggcagtgctctcggggaagagctaccatcaactgcaagagcagccagctcc
cttctgaacagcaggaccaggaagaattacctcgcttggtaccaacagaagcccggacagcctcctaagctcctgatctactgggectcaa
cccggaagagtgaggatgcccgatcgcttagcgggagcggctccgggacagatttcacactgacaatttcctcctgcaggccgaggacg
tcgccgtgtattactgtactcagagcttcattctgcggacattggcggcgggactaaagtggagattaag

В некоторых вариантах осуществления последовательности варибельной области тяжелой цепи анти-CD3 связывающих частей антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP представляют собой варианты аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 с С-концевыми делециями аминокислот SS.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающая часть получена из антител W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP, которые показаны в таблице В ниже. Последовательности CDR анти-CD3 связывающих частей антител W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Таблица В

Идентификационный номер антитела:		CDR1	CDR2	CDR3
W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP,	VH	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
		GFAFTDYYIH	WISPGNVNTKY NENFKG	DGYSLYYFDY
W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP	V _κ	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
		KSSQSLLNSRTRK NYLA	WASTRQS	TQSHTLRT

Последовательности варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи анти-CD3 связывающих частей антител W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO: 27):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDGYSLYYFDYWGGTLVTVSS

Нуклеотидная последовательность VH (SEQ ID NO: 55):

caggtgcagcttgtagctctggggcagaagtgaagaagcctgggtctagtgtaggtgtcatgcaaggctagcgggttcgcttactgactactacatccactgggtgctggcaggctcccggacaagggttgtagtgtaggtgtagctcccaggcaatgtcaacacaagtacaacgagaactcaaggccgctcaccattaccgcccagaagagcacctccacagcctacatggagctgtccagcctcagaag

cgaggacactgccgtctactactgtgccaggatgggtactccctgtattactttgattactggggccagggcacactggtgacagtgagct
сс

Аминокислотная последовательность V_κ (SEQ ID NO: 28):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQPPLLIY
WASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCTQSHLRTFGGGTKVEIK

Нуклеотидная последовательность V_κ (SEQ ID NO: 56):

gatatcgtgatgaccagagcccagactcccttgctgtctccctcggcgaaagagcaaccatcaactgcaagagctcccaag
cctgctgaactccaggaccaggaagaattacctggcctggtatcagcagaagcccggccagcctcctaagctgctcatctactgggcctcc
accggcagtctggggtgcccgatcggtttagtgatctgggagcgggacagacttcacattgacaattagctcactgcaggccgaggac
gtggcctgctactactgtactcagagccacactctccgcacattcggcggagggactaaagtggagattaag

В некоторых вариантах осуществления последовательности вариабельной области тяжелой цепи анти-CD3 связывающих частей антител W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP представляют собой варианты аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 с С-концевыми делециями аминокислот SS.

Анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, также содержат подходящие последовательности каркасной области (FR), при условии, что анти-CD3 связывающие части могут специфически связываться с CD3.

Анти-CD3 антитела по настоящему изобретению обладают специфической аффинностью связывания с клетками, экспрессирующими CD3 (например, CD4⁺ Т-клетки), и могут активировать Т-клетки человека и инициировать высвобождение цитокинов TNF α и IFN γ .

Аффинность связывания анти-CD3 связывающих частей, предложенных в настоящем документе, может быть выражена в терминах значения K_D , которое представляет собой отношение скорости диссоциации к скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}), когда связывание между антигеном и антигенсвязывающей молекулой находится в равновесии. Аффинность связывания с антигеном (например, K_D) может быть подходящим образом определена с использованием подходящих способов, известных в данной области техники, включая, например, анализы с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с антигеном в различных концентрациях может быть определено с помощью проточной цитометрии. Определенную среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) можно сначала нанести на график в зависимости от концентрации антитела, а затем уравнение односайтового насыщения $Y = B_{max} \times X / (K_D + X)$, где B_{max} относится к максимальному специфическому связыванию тестируемого антитела с

антигеном, можно приспособить к зависимости интенсивности флуоресценции специфического связывания (Y) от концентрации антитела (X) с использованием Prism версии 5 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния), и таким образом рассчитать значение K_D .

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, способны специфически связываться с CD3 человека или рекомбинантным CD3 человека, экспрессируемым на поверхности клетки. CD3 представляет собой рецептор, экспрессируемый на клетках. Рекомбинантный CD3 представляет собой растворимый CD3, который рекомбинантно экспрессируется и не связан с клеточной мембраной. Рекомбинантный CD3 может быть получен с использованием различных рекомбинантных методик. В одном примере последовательность CD3 ДНК, кодирующая внеклеточный домен CD3 человека (NP_000724.1) (Met1-Asp126), может быть слита с полигистидиновой меткой на С-конце в векторе экспрессии. Затем клетки 293E трансфицируют вектором экспрессии и оставляют экспрессировать продукт, который затем очищают с помощью никель-аффинной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, способны специфически связываться с CD3 человека, экспрессируемым на поверхности клетки, с аффинностью связывания (K_D) не более 5×10^{-9} М, не более 4×10^{-9} М, не более 3×10^{-9} М, не более 2×10^{-9} М, не более 10^{-9} М, не более 5×10^{-10} М, не более 4×10^{-10} М, не более 3×10^{-10} М, не более 2×10^{-10} М, не более 10^{-10} М, не более 5×10^{-11} М или не более 4×10^{-11} М, не более 3×10^{-11} М или не более 2×10^{-11} М или не более 10^{-11} М; значение K_D определяют с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, перекрестно реагируют с CD3 яванского макака (например, CD3 яванского макака, экспрессируемым на поверхности клетки, или растворимым рекомбинантным CD3 яванского макака).

Связывание анти-CD3 связывающих частей с рекомбинантным CD3 или CD3, экспрессируемым на поверхности клетки, может быть измерено с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, таких как сэндвич-методы (например, ELISA (иммуноферментный анализ)), вестерн-блоттинг, проточная цитометрия и другие анализы связывания. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, специфически связываются с рекомбинантным CD3 человека с EC_{50} (т.е. концентрацией 50% связывания) не более

0,01 нМ, не более 0,02 нМ, не более 0,03 нМ, не более 0,04 нМ, не более 0,05 нМ, не более 0,06 нМ, не более 0,07 нМ или не более 0,08 нМ; значение EC₅₀ определяют с помощью ELISA. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, специфически связываются с CD3 человека, экспрессируемым на поверхности клетки, с EC₅₀ не более 0,5 нМ, не более 0,6 нМ, не более 0,7 нМ, не более 0,8 нМ, не более 0,9 нМ, не более 1 нМ, не более 2 нМ, не более 3 нМ, не более 4 нМ, не более 5 нМ, не более 6 нМ, не более 7 нМ, не более 8 нМ, не более 9 нМ или не более 10 нМ; значение EC₅₀ определяют с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части связываются с CD3 яванского макака с аффинностью связывания, аналогичной аффинности связывания с CD3 человека.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, специфически связываются с рекомбинантным CD3 яванского макака с EC₅₀ не более 0,001 нМ, не более 0,005 нМ, не более 0,01 нМ, не более 0,02 нМ, не более 0,03 нМ, не более 0,04 нМ или не более 0,05 нМ; значение EC₅₀ определяют с помощью ELISA.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие части, предложенные в настоящем документе, обладают специфической аффинностью связывания с CD3 человека, достаточной для диагностического и/или терапевтического применения. Многие терапевтические схемы модулируют Т-клеточный иммунитет путем нацеливания на передачу сигналов TCR, в частности, путем клинического применения моноклональных антител к CD3 человека.

b) Анти-CD20 антитело

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в настоящем документе, первая антигенсвязывающая часть или вторая антигенсвязывающая часть представляет собой анти-CD20 связывающую часть.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающая часть получена из антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP, которые показаны в таблице A' ниже. Последовательности CDR анти-CD20 связывающих частей антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Таблица A'

Идентификационный номер антитела:		CDR1	CDR2	CDR3
W3278-T2U3.E17R-1.		SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9

uIgG4.SP, W3278-U3T2.F18R-1.	VH	GFTFNDYAMH	TISWNSGSIGYA DSVKG	DIQYGNYYYYG MDV
uIgG4.SP		SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
	V _K	RASQSVSSYLA	DASNRAT	QQRSNWPIT

Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и κ-легкой цепи анти-CD20 связывающих частей антител W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP и W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO: 29):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISW
NSGSIGYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDV
WGQGTTVTVSS

Нуклеотидная последовательность VH (SEQ ID NO: 57):

gaggtgcaattggtggagagcggaggaggctcgtgcagcctggaagatctcttaggctgagtgccgctgcatctgggtcac
attcaacgactacgccatgactgggtgaggcaggctcccggcaaggctggaatgggtgtcaactatctctggaactccggcagcat
cggctacgccgatagcgtcaaggccggtttacaatttcccgcgataacccaagaagtcctgtactgcagatgaacagcctgcccgc
cgaggatactgcctctactactgtgccaaggacattcagtagcgggaattactattacgggatggacgtctggggccaggggaccaccgtg
acagtcagctcc

Аминокислотная последовательность V_K (SEQ ID NO: 30):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFLTLSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK

Нуклеотидная последовательность V_K (SEQ ID NO: 58):

gaaatcgtgctgaccagtcaccagcaaccctctcccttctctctggagagagagctaccctcagctgtagggcctcacagctg
tctccagttactggtggtaccagcagaaccgggaggcccctagggtgctgatctacgacgccagcaataggccactggcatccc
agcccgggtttccggaagcggcagcgggacagatttcactcactattagcagcctggagcccaggacttcgccgtgactattgccag
cagcgggtccaactggcccattacattggccaaggacacgcctggagattaag

В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающая часть получена из антител W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP, которые показаны в таблице В' ниже. Последовательности CDR анти-CD20 связывающих частей антител W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Таблица В'

Идентификационный номер антитела:	CDR1	CDR2	CDR3
W3278-T3U2.F16-1.u	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21

IgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.	VH	GYTFTSYNMH	AIYPGNGDTSYN QKFKG	STYYGGDWYF NV
uIgG4.SP, W3278-T3U2.F17R-1.	V _K	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
uIgG4.SP		RASSSVSYIH	ATSNLAS	QQWTSNPPT

Последовательности переменных областей тяжелой цепи и κ-легкой цепи анти-CD20 связывающих частей антител W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP и W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP представлены ниже.

Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO: 31):

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYP
GNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW
GAGTTVTVSA

Нуклеотидная последовательность VH (SEQ ID NO: 59):

caggctccagctgcagcagcccggagccgaactggcacaaccggggctagcgtgaaaatgtcttgcagaagcaagtgggtaca
cattcactctcataacatgactgggtgaagcagacacctgggagcaggtctggaatggatcggcgccatctaccaggcaacggagaca
ctagctataatcagaagttaaaggaaaggccaccctgacagctgataagtcagctctaccgcttacatgcagctgagttcactgacaagtg
aggactcagcagtgactattgcgcccgttctactactatggcggagattggatttcaatgtgtggggcgccggtaccacagtcaccgtgt
ccgcc

Аминокислотная последовательность V_K (SEQ ID NO: 32):

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASG
VPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность V_K (SEQ ID NO: 60):

cagattgtcctgagccagagccctgccatcctgtctgtagtcccggcgagaaggtgacatgacatgcagggcatccagctct
gtctctacatccactgggtccagcagaagcccgggagttcacctaaaccatggatctacgctacatccaacctggcaagcgggtgtcctgt
caggttttcaggtccggcagcgaacatcttacagctctgactatttctcgggtggaggccgaagacgccgctactactattgccagcagtg
gacctccaatccccctacattcggcggagggaactaagctggagatcaaa

Анти-CD20 связывающие части, предложенные в настоящем документе, также содержат подходящие последовательности каркасной области (FR), при условии, что анти-CD20 связывающие части могут специфически связываться с CD20.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающие части, предложенные в настоящем документе, способны специфически связываться с CD20 человека, экспрессируемым на поверхности клетки, с аффинностью связывания (K_D) не более 5×10^{-9} М, не более 1×10^{-9} М, не более 9×10^{-10} М, не более 8×10^{-10} М, не более 7×10^{-10} М, не более 6×10^{-10} М, не более 5×10^{-10} М, не более 4×10^{-10} М, не более 3×10^{-10} М, не более 2×10^{-10} М или не более 1×10^{-10} М; значение K_D определяют с помощью проточной

цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающие части, предложенные в настоящем документе, перекрестно реагируют с CD20 яванского макака (например, CD20 яванского макака или растворимым рекомбинантным CD20 яванского макака, экспрессируемым на поверхности клетки).

Связывание анти-CD20 связывающих частей с CD20, экспрессируемым на клетке, может быть измерено с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, таких как сэндвич-методы (например, ELISA), вестерн-блоттинг, анализы на основе проточной цитометрии и другие анализы связывания. В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающие части, предложенные в настоящем документе, специфически связываются с CD20 человека, экспрессируемым на клетке, с EC_{50} не более 0,01 нМ, не более 0,02 нМ, не более 0,03 нМ, не более 0,04 нМ, не более 0,05 нМ, не более 0,1 нМ, не более 0,2 нМ, не более 0,3 нМ, не более 0,4 нМ, не более 0,5 нМ, не более 0,6 нМ, не более 0,7 нМ, не более 0,8 нМ, не более 0,9 нМ или не более 1 нМ; значение EC_{50} определяют с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающие части связываются с CD20 яванского макака с аффинностью связывания, аналогичной аффинности связывания с CD20 человека. В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающие части, предложенные в настоящем документе, специфически связываются с CD20 яванского макака, экспрессируемым на клетке, с EC_{50} не более 0,2 нМ, не более 0,5 нМ, не более 0,8 нМ, не более 1 нМ, не более 2 нМ или не более 3 нМ; значение EC_{50} определяют с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 связывающие части, описанные в настоящем документе, интернализируются CD20-экспрессирующими клетками с EC_{50} не более 1 пМ, не более 2 пМ, не более 3 пМ, не более 4 пМ, не более 5 пМ, не более 6 пМ, не более 7 пМ, не более 8 пМ, не более 9 пМ, не более 10 пМ, не более 11 пМ, не более 12 пМ, не более 13 пМ, не более 14 пМ, не более 15 пМ, не более 16 пМ, не более 17 пМ, не более 18 пМ, не более 19 пМ, не более 20 пМ, не более 21 пМ, не более 22 пМ, не более 23 пМ, не более 24 пМ, не более 25 пМ, не более 30 пМ, не более 35 пМ, не более 40 пМ, не более 45 пМ или не более 50 пМ; значение EC_{50} определяется с помощью анализа Fab-Zap.

Биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс

В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть и/или вторая антигенсвязывающая часть являются поливалентными, такими как двухвалентная, трехвалентная или четырехвалентная. Термин «валентный» в данном контексте относится

к наличию определенного количества антигенсвязывающих сайтов в данной молекуле. Таким образом, термины «двухвалентный», «четырёхвалентный» и «шестивалентный» указывают на наличие двух сайтов связывания, четырех сайтов связывания и шести сайтов связывания, соответственно, в антигенсвязывающей молекуле. Если оба сайта связывания предназначены для специфического связывания с одним и тем же антигеном или одним и тем же эпитопом, двухвалентная молекула может быть моноспецифической. Аналогично, трехвалентная молекула может быть биспецифической, например, когда два сайта связывания являются моноспецифическими в отношении первого антигена (или эпитопа), а третий сайт связывания является специфичным в отношении второго антигена (или эпитопа). В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть и/или вторая антигенсвязывающая часть в биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, описанном в настоящем документе, могут быть двухвалентными, трехвалентными или четырехвалентными и иметь по меньшей мере два сайта связывания в отношении одного и того же антигена или эпитопа. В некоторых вариантах осуществления это обеспечивает более сильное связывание с антигеном или эпитопом, чем соответствующее одновалентное антитело. В некоторых вариантах осуществления в двухвалентной антигенсвязывающей части первая валентность сайта связывания и вторая валентность сайта связывания являются структурно идентичными (т.е. имеют одинаковую последовательность) или структурно различными (т.е. имеют разные последовательности, но одинаковую специфичность).

В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть и/или вторая антигенсвязывающая часть являются поливалентными и содержат два или более антигенсвязывающих сайтов, которые функционально связаны друг с другом (со спейсером или без него).

В некоторых вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая часть содержит два или более Fab второго антитела. Два Fab могут быть функционально связаны друг с другом; например, первый Fab может быть ковалентно присоединен ко второму Fab через тяжелую цепь с промежуточным спейсером или без него.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть связана с первым доменом димеризации, а вторая антигенсвязывающая часть связана со вторым доменом димеризации. Термин «домен димеризации» в данном контексте относится к пептидным доменам, которые способны связываться друг с другом с образованием димера или, в некоторых примерах, пептидным доменам, которые обеспечивают спонтанную димеризацию двух пептидов.

В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации может быть

связан со вторым доменом димеризации. Связывание может быть достигнуто посредством любого подходящего взаимодействия, или связи, или связывания (например, посредством линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика или гидрофобно-гидрофильного взаимодействия или их комбинации). Иллюстративные домены димеризации включают, но не ограничиваются, шарнирную область антитела, домен СН₂ антитела, домен СН₃ антитела и другие подходящие белковые мономеры, которые способны димеризоваться и связываться друг с другом. Шарнирная область, домен СН₂ и/или СН₃ могут быть получены из любого изотипа антитела, такого как IgG1, IgG2 и IgG4.

«Дисульфидная связь» относится к ковалентной связи, имеющей структуру R-S-S-R'. Аминокислотный цистеин содержит сульфидрил группу, которая может образовывать дисульфидную связь со второй сульфидрил группой, например, из другого остатка цистеина. Дисульфидная связь может быть образована между сульфидрил группами двух остатков цистеина, присутствующих на двух полипептидных цепях, соответственно, с образованием таким образом межцепочечного мостика или межцепочечной связи.

Водородная связь образована электростатическим взаимодействием между двумя полярными группами, когда атом водорода ковалентно связан с высокоэлектроотрицательным атомом (таким как азот, кислород или фтор). Водородная связь может быть образована между каркасным кислородом (например, халькогенной группой) и амидным водородом (азотной группой) двух остатков в полипептиде, соответственно, например, между азотной группой в Asn и кислородной группой в His или между кислородной группой в Asn и азотной группой в Lys. Водородные связи сильнее, чем взаимодействия Ван-дер-Ваальса, но слабее, чем ковалентные или ионные связи, и имеют решающее значение для поддержания вторичных структур и третичных структур. Например, α -спираль образуется, когда расстояние между аминокислотными остатками регулярно возникает между положениями i и $i+4$, а β -лист представляет собой сегмент пептидной цепи из 3-10 аминокислот, образованный, когда два пептидных сегмента связаны по меньшей мере двумя или тремя каркасными водородными связями, образуя скрученный складчатый лист.

Электростатические взаимодействия являются нековалентными взаимодействиями и важны для укладки белка, стабильности, гибкости и функциональности; они включают ионные взаимодействия, водородные связи и галогенные связи. Электростатические взаимодействия могут образовываться в полипептидах, например, между Lys и Asp, между Lys и Glu, между Glu и Arg или между Glu и Trp на первой цепи и Arg, Val или Thr на

второй цепи.

Солевой мостик представляет собой электростатическое взаимодействие на близком расстоянии, возникающее главным образом из карбоксильного аниона Asp или Glu и катиона аммония из Lys или гуанидиния из Arg, которые представляют собой пару противоположно заряженных остатков в непосредственной пространственной близости в структуре нативного белка. Заряженные и полярные остатки при большой гидрофобной поверхности контакта могут действовать как «горячие точки» для связывания. Среди прочего, остатки с ионизируемыми боковыми цепями (такие как His, Tyr и Ser) также могут быть вовлечены в образование солевого мостика.

Гидрофобные взаимодействия могут образовываться между одним или более Val, Tyr и Ala на первой цепи и одним или более Val, Leu и Trp на второй цепи или между His и Ala на первой цепи и Thr и Phe на второй цепи (см. Brinkmann et al., 2017, выше).

В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации и/или второй домен димеризации содержат по меньшей мере часть шарнирной области антитела. В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации и/или второй домен димеризации могут дополнительно содержать домен CH2 антитела и/или домен CH3 антитела. В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации и/или второй домен димеризации содержат по меньшей мере часть шарнир-Fc-области, то есть шарнир-CH2-CH3-домен. В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации может быть функционально связан с C-концом первой константной области TCR. В некоторых вариантах осуществления второй домен димеризации может быть функционально связан с C-концом константной области CH1 антитела второй антигенсвязывающей части.

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, предложенном в настоящем документе, первый домен димеризации функционально связан с C-концом сконструированной константной области TCR, образуя химерную константную область. Другими словами, химерная константная область содержит первый домен димеризации, функционально связанный со сконструированной константной областью TCR.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область содержит сконструированный C β , присоединенный к первой шарнир-Fc-области, полученной из IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область дополнительно содержит домен CH2 первого антитела и/или домен CH3 первого антитела. Например, химерная константная область дополнительно содержит домен CH2-CH3 первого антитела, присоединенный к C-концу третьего соединительного домена.

Эти пары химерных константных областей и вторых константных областей TCR пригодны в том смысле, что ими можно манипулировать для слияния с желательной переменной областью антитела и, таким образом, для получения биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса, описанного в настоящем документе. Например, переменная область тяжелой цепи антитела может быть слита с химерной константной областью (включая C1) с получением первой полипептидной цепи биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса, описанного в настоящем документе, и аналогично, переменная область легкой цепи антитела может быть слита со второй константной областью TCR (включая C2) с получением второй полипептидной цепи биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления второй домен димеризации содержит шарнирную область. Шарнирная область может быть получена из антитела, такого как IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления второй домен димеризации необязательно может дополнительно содержать домен CH2 антитела и/или домен CH3 антитела, такой как шарнир-Fc-область. Шарнирная область может быть присоединена к тяжелой цепи антитела второго антигенсвязывающего сайта (например, Fab).

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе первый домен димеризации и второй домен димеризации могут быть связаны с образованием димера. В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации и второй домен димеризации являются различными и связаны таким образом, который препятствует гомодимеризации и/или способствует гетеродимеризации. Например, первый домен димеризации и второй домен димеризации могут быть выбраны таким образом, что они не являются идентичными, и они предпочтительно образуют гетеродимеры друг с другом, а не гомодимеры с самим собой. В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации и второй домен димеризации могут быть связаны с образованием гетеродимера посредством образования «выступов-во-впадины», гидрофобного взаимодействия, электростатического взаимодействия, гидрофильного взаимодействия или повышенной гибкости. В отношении «выступов-во-впадины» см. Ridgway et al., *Protein Engineering*, 9(7), pp.617-21(1996); Merchant et al., *Nature Biotechnology*, 16(7), pp.677-681(1998); etc.

В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации и второй домен димеризации содержат домен CH2 и/или домен CH3, каждый из которых мутирован таким образом, что он может образовывать выступы-во-впадины. Выступ может быть получен путем замены небольшого аминокислотного остатка на большой аминокислотный остаток

в первом полипептиде CH₂/CH₃, а впадину можно получить путем замены большого аминокислотного остатка на маленький аминокислотный остаток. Для получения подробной информации о сайтах мутаций для «выступов-во-впадины» см. Ridgway et al., 1996, выше; Spiess et al., 2015, выше; и Brinkmann et al., 2017, выше.

Биспецифический формат

В биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе, описанном в настоящем документе, первая антигенсвязывающая часть и вторая связывающая часть могут быть связаны с образованием Ig-подобной структуры. Подобно нативному антителу, Ig-подобная структура имеет Y-образную конфигурацию с двумя плечами для связывания антигена и одним стеблем для связывания и стабилизации. Сходство с нативными антителами может обеспечить множество преимуществ, таких как хорошая фармакокинетика *in vivo*, желаемые иммунные ответы, стабильность и т. д. Было обнаружено, что Ig-подобные структуры, содержащие первую антигенсвязывающую часть, предложенную в настоящем документе, в сочетании со второй антигенсвязывающей частью, предложенной в настоящем документе, обладают термической стабильностью, сопоставимой с термической стабильностью Ig (например, IgG). В некоторых вариантах осуществления Ig-подобная структура, предложенная в настоящем документе, представляет собой по меньшей мере 70 %, 80 %, 90 %, 95 % или 100 % нативного IgG.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит 4 полипептидные цепи: i) VH1-C1-шарнир-CH₂-CH₃; ii) VL1-C2; iii) VH2-CH1-шарнир-CH₂-CH₃ и iv) VL2-CL, где C1 и C2 способны образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь, и две шарнирные области и/или два домена CH₃ способны образовывать одну или более межцепочечных связей, которые могут способствовать димеризации.

По сравнению с биспецифическими полипептидными комплексами в других форматах, биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, предложенный в настоящем документе, имеет более длительный период полужизни *in vivo* и относительно прост в изготовлении.

Последовательность биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса

В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса способна специфически связываться с CD3, и вторая антигенсвязывающая часть способна специфически связываться с CD20. В других вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса способна специфически связываться с CD20, и вторая антигенсвязывающая часть способна

специфически связываться с CD3.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит комбинацию четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (антитело W3278-T3U2.E17R-1.uIgG4.SP), как показано в Примере 2. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит комбинацию четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 (антитело W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP), как показано в Примере 2. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит комбинацию четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, как показано в примере 2. В определенном варианте осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит пять полипептидных цепей: а) первую полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 41; б) вторую полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 42; с) третью полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 43; d) четвертую полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 43; и е) пятую полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 44. Например, в конкретном варианте осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс представляет собой антитело W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP, которое содержит две анти-CD20 связывающие части, домен VH-CH1 тяжелой цепи одной из которых функционально связан с доменом VH тяжелой цепи анти-CD3 связывающей части, как показано в примере 2. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит комбинацию четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 (антитело W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP), как показано в Примере 2. В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит комбинацию четырех полипептидных последовательностей: SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52 (антитело W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP), как показано в Примере 2. В таких вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть связывается с CD3, и вторая антигенсвязывающая часть связывается с CD20.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит 4 полипептидные цепи, включая: i) VH1, функционально связанный с первой химерной константной областью; ii) VL1,

функционально связанный со второй химерной константной областью; iii) VH2, функционально связанный с обычной константной областью тяжелой цепи антитела, и iv) VL2, функционально связанный с обычной константной областью легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления первая химерная константная область может содержать C1-шарнир-CH2-CH3, каждая часть которого является такой, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления вторая химерная константная область может содержать C2, которая является такой, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления обычная константная область тяжелой цепи антитела может содержать CH1-шарнир-CH2-CH3, каждая часть которого является такой, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления обычная константная область легкой цепи антитела может содержать CL, которая является такой, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более аминокислот в нативных сайтах гликозилирования в положениях 193, 182, 203, 206 и 207 полипептидной цепи, представленной в SEQ ID NO: 44, модифицированы; предпочтительно, аминокислота в положении 193 модифицирована. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификации включают одну или более из S193X, S182X, S203X, S206X и S207X, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от серина (Ser) и/или треонина (Thr). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения модификация представляет собой S193X, где X представляет собой аланин (Ala), глицин (Gly), пролин (Pro) или валин (Val). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутация удаляет сайт O-гликозилирования; тип O-гликозилирования представляет собой O-сахарид в конфигурации Core1 со структурной формулой NeuAc-Gal-GalNAc или NeuAc-Gal-(NeuAc)GalNAc.

Как описано выше, модифицированный биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, который был получен путем модификации нативных сайтов гликозилирования в соответствующих полипептидных цепях по настоящему изобретению, более похож на нативное антитело и имеет значительно сниженную иммуногенность, увеличенный период полужизни и улучшенную пригодность для разработки лекарства.

Способ получения

Настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте или полинуклеотиду, кодирующему биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс, описанный в настоящем документе.

Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» в данном контексте относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК)

и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Если конкретно не указано иное, термин охватывает полинуклеотиды, содержащие известные нативные аналоги нуклеотидов, которые обладают связывающими свойствами, аналогичными свойствам референсной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются аналогично встречающимся в природе нуклеотидам. Если не указано иное, конкретная полинуклеотидная последовательность также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, гомологичные гены, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанные последовательности. В частности, замены вырожденных кодонов могут быть достигнуты путем генерирования последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено смешанными основаниями и/или остатками дезоксиинозина (см. Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Нуклеиновая кислота или полинуклеотид, кодирующие биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс, описанный в настоящем документе, могут быть сконструированы с использованием рекомбинантных методик. С этой целью ДНК, кодирующую антигенсвязывающую часть (например, CDR или вариабельную область) исходного антитела, можно выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую цепь и легкую цепь антитела). Аналогичным образом, также может быть получена ДНК, кодирующая константную область TCR. В качестве примера, полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен (VH), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую константную область (C1) TCR, получают и функционально связывают для обеспечения транскрипции и экспрессии в клетке-хозяине с получением первого полипептида. Аналогичным образом, полинуклеотидная последовательность, кодирующая VL, функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей C1, для обеспечения экспрессии второго полинуклеотида в клетке-хозяине. При необходимости кодирующие полинуклеотидные последовательности для одного или более спейсеров также могут быть функционально связаны с другими кодирующими последовательностями для обеспечения экспрессии желаемого продукта.

Кодирующие полинуклеотидные последовательности могут быть дополнительно функционально связаны с одной или более контрольными последовательностями, необязательно в векторе экспрессии, так что экспрессия или продукция первого полипептида и второго полипептида возможна и находится под соответствующим

контролем.

Кодирующие полинуклеотидные последовательности могут быть вставлены с использованием рекомбинантных методик, хорошо известных в данной области техники, в векторы для дальнейшего клонирования (амплификация ДНК) или для экспрессии. В другом варианте осуществления полипептидный комплекс и биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс, описанный в данном документе, могут быть получены путем гомологичной рекомбинации, хорошо известной в данной области техники. Многие векторы являются доступными. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются, одно или более из следующего: сигнальная последовательность, источник репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор (например, SV40, CMV, EF-1α) и последовательность терминации транскрипции.

Векторы, содержащие полинуклеотидные последовательности, описанные в настоящем изобретении, могут быть введены в клетки-хозяева для клонирования или экспрессии генов. Используемый в настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую введен экзогенный полинуклеотид и/или вектор. Клетки-хозяева трансформируют векторами для экспрессии или клонирования, описанными выше, и культивируют в среде.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу экспрессии биспецифического анти-CD3×CD20 полипептидного комплекса, описанного в настоящем документе, который включает культивирование клетки-хозяина, описанной в настоящем документе, в таких условиях, при которых экспрессируется биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического анти-CD3×CD20 полипептидного комплекса, описанного в настоящем документе, который включает: а) введение в клетку-хозяина одного или более полинуклеотидов, кодирующих первую антигенсвязывающую часть, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид (первый полипептид содержит, от N-конца к C-концу, первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, который функционально связан с первой константной областью (C1) T-клеточного рецептора (TCR)), второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид (второй полипептид содержит, от N-конца к C-концу, первый вариабельный домен легкой цепи (VL) первого антитела, который функционально связан со второй константной областью (C2) TCR), и один или более дополнительных полинуклеотидов, кодирующих вторую антигенсвязывающую часть, где: C1 и C2 способны образовывать димер, и ненативная межцепочечная связь способна стабилизировать димер C1 и C2; первая

антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть имеют уменьшенное неправильное спаривание по сравнению со случаем, когда первая антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть являются природными аналогами нативных Fab, и первое антитело обладает первой антигенной специфичностью, и второе антитело обладает второй антигенной специфичностью; и b) иницирование экспрессии клеткой-хозяина биспецифического анти-CD3×CD20 полипептидного комплекса. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение биспецифического анти-CD3×CD20 полипептидного комплекса.

Биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс, описанный в настоящем документе, полученный из клетки-хозяина, может быть очищен с использованием таких способов, как гидроксиапатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ, ионообменная хроматография с ДЭАЭ-целлюлозой (диэтиламиноэтил-целлюлоза), осаждение сульфатом аммония, высаливание и аффинная хроматография, причем аффинная хроматография является предпочтительным методом очистки.

Когда биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс, описанный в настоящем документе, содержит домен Fc иммуноглобулина, белок А может быть использован в качестве аффинного лиганда в зависимости от вида и изотипа домена Fc, присутствующего в полипептидном комплексе. Белок А можно применять для очистки полипептидных комплексов на основе тяжелой цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Белок G применим ко всем изотипам мыши и $\gamma 3$ человека (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Агароза является наиболее часто используемой матрицей присоединения аффинного лиганда, но также могут быть использованы другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стирол)бензол, могут обеспечивать более высокую скорость потока и более короткое время обработки по сравнению с агарозой.

Когда биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс, описанный в настоящем документе, содержит домен CH3, очистку можно проводить с использованием смолы Bakerbond ABX.TM (J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey). Также могут быть использованы другие методы очистки белка, такие как фракционирование в ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая HPLC, хроматография на силикагеле, гелевая хроматография на гепарин-агарозе на анионообменной или катионообменной смоле (например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от антитела, подлежащего выделению.

После любых предварительных стадий очистки смесь, содержащую представляющий интерес полипептидный комплекс и примеси, можно обрабатывать с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием с низким рН с использованием элюирующего буфера, имеющего рН около 2,5-4,5, предпочтительно при низкой концентрации соли (например, при концентрации соли от около 0 до 0,25 М).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический анти-CD3×CD20 полипептидный комплекс, описанный в настоящем документе, может быть легко очищен с высоким выходом с использованием обычных способов. Одним из преимуществ биспецифического анти-CD3×CD20 полипептидного комплекса является то, что неправильное спаривание между переменными доменами тяжелой цепи и переменными доменами легкой цепи значительно снижается. Это уменьшает образование нежелательных побочных продуктов и позволяет получать продукты высокой чистоты с высоким выходом с использованием относительно простых процессов очистки.

Следующие примеры приведены для лучшей иллюстрации настоящего изобретения, и их не следует толковать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Все конкретные композиции, материалы и способы, описанные ниже, полностью или частично, входят в объем настоящего изобретения. Эти конкретные композиции, материалы и способы не предназначены для ограничения настоящего изобретения, а предназначены просто для иллюстрации конкретных вариантов осуществления, которые подпадают под объем настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники могут разрабатывать эквивалентные композиции, материалы и способы, не прилагая изобретательских усилий и без отступления от объема настоящего изобретения. Следует понимать, что различные модификации способа по настоящему изобретению все еще могут быть включены в объем настоящего изобретения. Авторы изобретения предполагают, что такие варианты должны быть включены в объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1

Получение материалов и референсных антител

1. Получение материалов

Информация о коммерчески доступных материалах, используемых в примерах, приведена в таблице 1.

Таблица 1. Коммерчески доступные материалы

Материал	Распространитель	Кат.
----------	------------------	------

Набор для выделения CD4 ⁺ Т-клеток (человек)	Stemcell	19052
Набор для выделения CD8 ⁺ Т-клеток (человек)	Stemcell	19053
Кальцеин-АМ	Invitrogen	C3099
CellTracker™ FarRed	Invitrogen	C34572
Пропидия йодид (PI)	Invitrogen	P3566
Alexa Fluor647-конъюгированный козий античеловеческий IgG Fc	Jackson	109-605-098
FITC-меченное античеловеческое CD4	BD Pharmingen	550628
PerCP-Cy5.5-меченное античеловеческое CD8	BD Pharmingen	565310
PE-меченное античеловеческое CD69	BD Pharmingen	555531
APC-меченное античеловеческое CD25	BD Pharmingen	555434
Иммобилизованное антитело очищенное античеловеческое TNF	BD Pharmingen	555212 (51-26371E)
Детектирующее антитело биотинилированное моноклональное антитело к TNF человека	BD Pharmingen	555212 (51-26372E)
Ферментный реагент стрептавидин-HRP	BD Pharmingen	555212 (51-9002813)
Рекомбинантное человеческое TNF стандарт	BD Pharmingen	555212 (51-26376E)
Мышиное антитело mAb IgG2A к IL-2 человека/примата	R&D	MAB602
Биотинилированное антитело к IL-2 человека/примата	R&D	BAF202
Рекомбинантный человеческий IL-2	R&D	202-IL
Jurkat	ATCC	TIB-152
Raji	ATCC	CCL-86
NAMALWA	ATCC	CRL-1432
Ramos	ATCC	CRL-1596
SU-DHL-1	ATCC	CRL-2955

2. Генерация референсных антител

В примерах в качестве референсных антител использовали два референсных антитела W327-ВМК1 и W327-ВМК4.

Референсное антитело ВМК1 к CD20 человека (ритуксимаб) было получено на основе последовательности клона С2В8 из патентной заявки США US 20140004037 А1. Ген для референсного биспецифического анти-CD3×CD20 антитела ВМК4 (REGN1979) синтезировали в соответствии с последовательностью в заявке на патент США US 20150266966 А1. Антитела ВМК экспрессировали клетками Expi293, а затем очищали с помощью хроматографии на белке А.

Пример 2

Получение биспецифических антител по настоящему изобретению

1. Дизайн и конструирование антител и химерных белков TCR

Последовательность TCR

TCR представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из двух цепей. Около 95 % Т-клеток человека имеют TCR, состоящий из α -цепи и β -цепи. Учитывая, что для β -цепи TRBC1 доступно больше кристаллических структур, последовательности TRBC1 были выбраны в качестве основного остова для применения при конструировании полипептидного комплекса («WuXiBody»), описанного в настоящем документе. Типичную аминокислотную последовательность TRBC1 можно найти в структуре 4L4T банка данных белковых структур (PDB).

Межцепочечная дисульфидная связь TCR

Кристаллическая структура TCR использовалась для руководства конструирования WuXiBody согласно изобретению. В отличие от нативного TCR, закрепленного на мембране поверхности Т-клеток, растворимые молекулы TCR менее стабильны, хотя их трехмерная структура очень похожа на структуру антитела Fab. Фактически, нестабильность растворенного TCR раньше была значительным препятствием, которое затрудняло выяснение его кристаллической структуры (см. Wang, Protein Cell, 5(9), pp.649-652 (2014)). Авторы изобретения приняли стратегию введения пары мутаций Cys в константную область TCR и обнаружили, что это может значительно улучшить сборку цепи и усилить экспрессию.

Все соединительные области, связывающие переменные домены антитела и константный домен TCR, их относительные ориентации слияния и соединительные области, связывающие Fc, были тщательно настроены. Поскольку структура TCR очень похожа на структуру антитела Fab, авторы наложили модель гомологии антитела Fv на переменную область TCR (PDB 4L4T). Наложенная структура указывает, что антитело Fv структурно совместимо с константным доменом TCR. Все соответствующие параметры

конструирования были спроектированы на основе этого структурного выравнивания и соответствующих последовательностей.

2. Получение биспецифических антител по настоящему изобретению

BsAb W3278 получали в виде человеческого IgG4 в формате «выступ-во-впадину» (S. Atwell, J. B. Ridgway, J. A. Wells, P. Carter, Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J. Mol. Biol.* 270, 26–35 (1997); и C. Spiess, M. Merchant, A. Huang, et al. D. G. Yansura, J. M. Scheer, Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. *Nat. Biotechnol.* 31, 753–758 (2013)). Fc-область IgG4 человека была сконструирована с мутацией S228P. Моноклональные антитела к CD3 получали путем иммунизации мышей белком человека CD3ε и CD3δ ECD с использованием гибридомной технологии в соответствии с внутренним протоколом. Последовательности вариабельной области анти-CD20 плеча были основаны на последовательности офатумумаба (клон 2F2 из публикации PCT № WO 2010083365A1) или ритуксимаба (клон C2B8 из патентной заявки США US 20140004037 A1). Последовательности кандидатов W3278 BsAb перечислены в Таблице 2. Их последовательности ДНК синтезировали в Genewiz (Шанхай) и клонировали в модифицированные векторы экспрессии pcDNA3.3. Векторы экспрессии анти-CD20 плеча и анти-CD3 плеча совместно трансфицировали в Expi293 (Invitrogen-A14527) с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine293 (Invitrogen-A14524). Клетки культивировали в среде экспрессии Expi293 (Invitrogen-A1435101) на орбитальном шейкере, вращающемся при 135 об/мин в инкубаторе при 37 °C, содержащем увлажненную атмосферу с 8 % CO₂. Супернатант культуры собирали, и белок очищали с использованием колонки с белком А (GE Healthcare, 17543802). Концентрацию белка измеряли с помощью UV-Vis (ультрафиолетовая и видимая область спектра) спектрофотометра (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Чистоту белка оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической HPLC-SEC. На фиг. 1 показана схема для кандидатов W3278-BsAb.

Таблица 2. Последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи каждого BsAb

Идентификатор клона	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
W3278-T2U3. E17R-1.uIgG4 .SP	H1 33	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYSFTTYYIHWV RQAPGQGLEWMGWIFPGNDNIKYSEKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIDSVSIYYFDYWGGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP

		<p>EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
H2	34	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPG KGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSL RAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTITVLEDLKNNF PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVH SGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPVNHFRCAVQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRYGPCCPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITV DKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
L1	35	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRKSQVDPDRFSGSGSGTDF TLTISLQAEDVAVYYCTQSFILRTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIKPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
L2	36	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQQR SNWPITFGQGRLEIKPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTQVVSQKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNNAVAWSQKSDFAKAN AFQNSIIPEDTFFPSPESS</p>

W3278-T3U2. F16-1.uIgG4.S P	H1	37	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFAFTDYYIHWVRQAPGQ GLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDVAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGTLLVTVLEDLKLVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPNRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVS.AEAWGRYGPPCPPCAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDLAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
	H2	38	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW VKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNW GAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVGGGGSGG GGSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLT ADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFN VWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV VDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
	L1	39	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTQVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSQK SDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS</p>
	L2	40	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVQPKP</p>

			GSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
W3278-U2T3. F18R-1.uIgG4 .SP	H1	41	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGFAFT DYYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDIAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLV TVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELS WWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQN PRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQVSAEAWGRYGPCCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL G
	H2	42	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW VKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW GAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

	L1	43	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKP GSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
	L2	44	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSDFTLTISLQAEDV AVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNNAVAWSQK SDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS</p>
<p>W3278-U3T2. F18R-1.uIgG4 .SP</p>	H1	45	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPG KGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNACKSLYLQMNSL RAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYS FTTYIHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGNDNIKYSEKFKGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAIDSVSIYYFDYWGQGTLV TVLEDLKLVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAITFWQN PRNHFRCAVQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRYGP PCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSL LG</p>
	H2	46	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWV RQAPGKLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDN ACKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDV WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV</p>

			<p>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
	L1	47	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPK GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQRSNWPITFGQGTTRLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
	L2	48	<p>DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRKSQVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCTQSFILRTFGGGTKVEIK<i>PDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV</i> <i>CLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQK</i> <i>SDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS</i></p>
<p>W3278-T3U2. F17R-1.uIgG4 .SP</p>	H1	49	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFAFTDYYIHVWRQAPGQ GLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGTLVTVLEDLKLVFPPEVA <i>VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCT</i> <i>DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLS</i> <i>ENDEWTQDRAKPVTQIVS.AEAWGRGGGGSGGGGSQVQLQQPGA</i> ELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAI YPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSR TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLG</p>
	H2	50	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW VKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW GAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV</p>

			KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLG
	L1	51	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIK <i>PDIQNPDP</i> AVYQLRDSKSSDKSV <i>CLFTDFDSQTQVSQKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQK</i> <i>SDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS</i>
	L2	52	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKP GSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNFPYQVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Примечание: Последовательности TCR показаны курсивом.

Кроме того, для биспецифического антитела W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP одна или более аминокислот в нативных сайтах гликозилирования в положениях 193, 182, 203, 206 и 207 легкой цепи, приведенных в SEQ ID NO: 44, были модифицированы авторами изобретения, предпочтительно, аминокислота в положении 193 модифицирована. В некоторых вариантах осуществления модификации включают одну или более из S193X, S182X, S203X, S206X и S207X, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от серина (Ser) и/или треонина (Thr). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления модификация представляет собой S193X, где X представляет собой аланин (Ala), глицин (Gly), пролин (Pro) или валин (Val). Мутация, описанная выше, удаляла сайт O-гликозилирования; тип O-гликозилирования представлял собой O-сахарид в конфигурации Core1 со структурной формулой NeuAc-Gal-GalNAc или NeuAc-Gal-(NeuAc)GalNAc.

Как описано выше, модифицированное биспецифическое антитело, которое было получено путем модификации нативных сайтов гликозилирования в соответствующих полипептидных цепях раскрытого в настоящем документе биспецифического антитела,

было более похоже на нативное антитело и имело значительно сниженную иммуногенность, увеличенный период полужизни и улучшенную пригодность для разработки лекарства.

Пример 3

Характеристика *in vitro*

1. Клеточные линии и выделение первичных клеток

Использовали следующие клеточные линии, культивированные в полной среде (RPMI1640 с добавлением 10% FBS (фетальная бычья сыворотка), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина): Jurkat (CD3+/CD20- клетки), Raji, Ramos и NAMALWA (CD20+/CD3- клетки) и SU-DHL-1 (CD20-/CD3- клетки).

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека были свежевыделены из гепаринизированной венозной крови здоровых нормальных доноров путем центрифугирования по плотности с использованием Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare-17-1440-03). Первичные CD8⁺ Т-клетки человека выделяли из свежих МКПК человека с использованием набора EasySep (Stemcell-19053), и CD4⁺ Т-клетки очищали с использованием колонки EasySep (Stemcell-19052).

2. Связывание W3278 BsAb с клетками-мишенями

Связывание W3278 BsAb с клетками-мишенями определяли с помощью проточной цитометрии. Вкратце, 1×10^5 /лунку клеток-мишеней (CD3+/CD20- клеток или CD20+/CD3- клеток) инкубировали с серийными разведениями W3278 BsAb или контрольного антитела изотипа IgG4 человека при 4 °C в течение 60 минут. После инкубации клетки дважды промывали холодным 1% BSA (бычий сывороточный альбумин)/1×PBS (фосфатно-солевой буфер). Затем добавляли Alexa Fluor647-конъюгированный козий античеловеческий IgG Fc (Jackson-109-605-098) и инкубировали клетки при 4 °C в течение 30 минут. После двукратной промывки измеряли геометрическое среднее значение флуоресценции (MFI) окрашенных клеток с использованием гемоцитометра FACS Canto II (BD Biosciences). Лунки, не содержащие антитело или содержащие только флуоресцентное вторичное антитело, использовали для установления фоновой флуоресценции. Значения EC₅₀ для связывания клеток определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния); каждое значение рассчитывали с помощью четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа. FACS связывание W3278 BsAb с клетками-мишенями показано на фиг. 2, и EC₅₀ связывания показаны в таблице 3 ниже.

Таблица 3. EC₅₀ FACS-связывания W3278 BsAb и исходных антител с мишенями клеточной поверхности

Антитела	Jurkat		Raji	
	EC ₅₀ (нМ)	Лучшее MFI	EC ₅₀ (нМ)	Лучшее MFI
W3278-T2U3.E17R-1.uIgG4.SP	128,7	3876	13,2	68500
W3278-T3U2.F16-1.uIgG4.SP	58,9	6753	более 1000	55200
W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP	41,7	4077	2,5	66700
W3278-U3T2.F18R-1.uIgG4.SP	26,6	536	1,3	55400
W3278-T3U2.F17R-1.uIgG4.SP	17,3	7355	85,3	64900
Анти-CD3 Fab (T2)	33,0	3214		
Анти-CD3 Fab (T3)	43,7	3803		
Анти-CD20. IgG4 (U2)			11,4	53500
Анти-CD20. IgG4 (U3)			0,9	33300

Для определения одновременного связывания W3278 BsAb с клетками, экспрессирующими CD3 и CD20, 1×10^6 /мл клеток Raji и 1×10^6 /мл клеток Jurkat метили 50 нМ кальцеина-АМ (Invitrogen-C3099) и 20 нМ FarRed (Invitrogen-C34572), соответственно. После промывки холодным 1% BSA/1XPBS меченые клетки Raji и клетки Jurkat ресуспендировали и смешивали в соотношении 1:1 до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Смешанные клетки высевали при 1×10^5 /лунку и затем добавляли серийные разведения W3278 BsAb. После инкубации при 4 °С в течение 60 мин процент двойных кальцеин-АМ и FarRed-положительных клеток анализировали с помощью FACS.

Результаты на фиг. 3 показывают, что основное W3278 BsAb продемонстрировало дозозависимое одновременное связывание с двумя мишенями, которое было более эффективным, чем связывание ВМК4.

3. Анализы цитотоксичности *in vitro*

Эффективность BsAb в отношении регулирования лизиса опухолевых клеток с помощью CD8⁺ Т-лимфоцитов определяли с помощью анализов цитотоксичности на основе FACS. Вкратце, свежесыведенные CD8⁺ Т-клетки человека культивировали в течение 3-5 дней в полной среде, содержащей 50 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 человека и 10 нг/мл ОКТ-3. На следующий день клетки-мишени Raji, Ramos, NAMALWA и SU-DHL-1 (1×10^6 клеток/мл) метили 20 нМ Far-Red в DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко, Invitrogen-C34572) при 37 °С в течение 30 минут, а затем дважды промывали буфером для анализа (среда RPMI 1640 без фенолового красного + 10% FBS). Far-Red-меченные клетки-мишени, (2×10^4 /лунку) высевали в 110 мкл/лунку полной среды, содержащей эффекторные CD8⁺ Т-клетки (соотношение эффекторных/клеток-мишеней 5:1) и серийные разведения BsAb или контроля изотипа hIgG4, и инкубировали в течение ночи при 37 °С.

Наконец, добавляли пропидия йодид (PI) (Invitrogen-P3566), и клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент цитотоксичности рассчитывали с использованием следующего уравнения: $\text{цитотоксичность}\% = 100 \times \frac{\text{Far Red}^+\text{PI}^-}{(\text{Far Red}^+\text{PI}^- + \text{Far Red}^+\text{PI}^+)} \times 100\%$. Значения EC₅₀ цитотоксичности in vitro определяли с помощью четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа Prism.

Результаты на фиг. 4 показывают, что основное антитело W3278 «W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4» не уничтожало CD20-отрицательные клетки SU-DHL-1. Основное антитело W3278 «W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4» индуцировало уничтожение CD20-положительных клеток более эффективно, чем BMK4, и EC₅₀ эффективности уничтожения увеличивалась пропорционально уровню экспрессии CD20 на поверхности клетки. EC₅₀ BsAb-опосредованной цитотоксичности и максимальная цитотоксичность (Max Cyto)% показаны в таблице 4.

Таблица 4. EC₅₀ цитотоксичности и максимальная цитотоксичность% основного W3278 BsAb и BMK4 BsAb на различных линиях В-клеток

Антитела	Raji		Ramos		NAMALWA		SU-DHL-1	
	EC ₅₀ (пМ)	Max Cyto%						
WBP327-BMK4.uIgG4	21,49	36,4	119,2	24,6	411,7	40,3	53,59	6,1
W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.	0,52	41,7	1,25	17,1	46,8	33,0	нет данных	1,6

4. Анализы клеточной активации и высвобождения цитокинов

BsAb-опосредованную активацию Т-клеток оценивали путем измерения экспрессии эффекторных клеток CD69 или CD25 с помощью проточной цитометрии. Свежевыделенные очищенные CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки отдельно тестировали в качестве эффекторных клеток. Вкратце, 5×10⁴ CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток высевали в 110 мкл/лунку полной среды, содержащей серийные разведения BsAb или контрольного антитела изотипа hIgG4, в присутствии 1×10⁴ клеток Raji или SU-DHL-1/лунку при 37 °С в течение 24 часов. После инкубации клетки дважды промывали 1% BSA/1XDPBS, а затем окрашивали группой античеловеческого Ab (FITC-меченный античеловеческий CD4 (BD Pharmingen-550628); PerCP-Cy5.5-меченный античеловеческий CD8 (BD Pharmingen-565310); PE-меченный античеловеческий CD69 (BD Pharmingen-555531) и APC-меченный античеловеческий CD25 (BD Pharmingen-555434)) при 4 °С в течение 30 мин. Активацию Т-клеток, оцененную с помощью экспрессии CD69 или CD25,

анализировали с помощью FACS. EC₅₀ активации Т-клеток определяли с помощью четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа.

В отсутствие клеток-мишеней основное антитело W3278 не индуцировало активацию Т-клеток. Основное антитело W3278 индуцировало активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток только в присутствии клеток-мишеней, как показано посредством экспрессии CD25 (фиг. 5А) и экспрессии CD69 (фиг. 5В), и это было более эффективно, чем ВМК4. EC₅₀ активации показана в таблицах 5А и 5В.

Таблица 5А. EC₅₀ экспрессии CD25 Т-клетками, опосредованной W3278 BsAb и ВМК4 BsAb в присутствии клеток Raji

Антитела	CD4 ⁺ /Raji		CD8 ⁺ /Raji	
	EC ₅₀ (пМ)	Макс. %	EC ₅₀ (пМ)	Макс. %
W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.	0,6	34,0	0,8	39,3
WBP327-ВМК4.uIgG4	6,5	37,1	8,2	46,5

Таблица 5В. EC₅₀ экспрессии CD69 Т-клетками, опосредованной W3278 BsAb и ВМК4 BsAb в присутствии клеток Raji

Антитела	CD4 ⁺ /Raji		CD8 ⁺ /Raji	
	EC ₅₀ (пМ)	Макс. %	EC ₅₀ (пМ)	Макс. %
W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP	0,2	61,8	0,4	83,8
WBP327-ВМК4.uIgG4	3,5	64,2	7,3	86,0

Для анализов высвобождения цитокинов (TNF-α и IL-2) 5×10⁴ свежесыведенных CD4⁺ Т-клеток высевали в 110 мкл/лунку полной среды, содержащей серийные разведения BsAb или контрольного антитела изотипа hIgG4, в присутствии 1×10⁴ клеток Raji или SU-DHL-1/лунку при 37 °С в течение 24 часов. Через 24 часа инкубации планшет центрифугировали, супернатант собирали и хранили при минус 80 °С для измерения концентрации цитокинов с помощью ELISA.

Для обнаружения TNF-α с помощью ELISA 96-луночный планшет для ELISA (Nunc MaxiSorp, ThermoFisher) покрывали 50 мкл очищенного иммобилизованным антителом античеловеческого TNF (BD Pharmingen-51-26371E) в карбонат-бикарбонатном буфере (20 мМ Na₂CO₃, 180 мМ NaHCO₃, pH 9,2) в течение ночи при 4 °С. На следующий день планшет промывали промывочным буфером (1X буфер PBST, 0,05% твин-20), а затем блокировали 200 мкл разбавителя для анализа (PBS + 10% FBS). После блокирования добавляли 50 мкл тестируемого образца и рекомбинантного стандарта TNF человека (BD

Pharmingen-51-26376E) и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Связывание TNF- α с планшетом обнаруживали с помощью детектирующего антитела, биотинилированного античеловеческого TNF (BD Pharmingen-51-26372E). Для реакции окрашивания использовали реагент стрептавидин-HRP (BD Pharmingen-51-9002813) и тетраметилбензидиновый (TMB) субстрат (Sigma-860336-5G). Промывку проводили с помощью промывочного буфера между стадиями. Приблизительно через 30 мин реакцию окрашивания останавливали с помощью 2 М HCl. Оптическую плотность каждой лунки измеряли при 450 нм с использованием многофункционального планшетного ридера (SpectraMax[®] M5e).

Аналогичным образом, концентрацию IL-2 в культуральном супернатанте измеряли с помощью ELISA. В качестве иммобилизованного антитела использовали антитело mAb к IL-2 человека (R&D-MAB602), а в качестве детектирующего антитела использовали биотинилированное антитело к IL-2 человека (R&D-BAF202).

Как показано на фиг. 6, основное антитело W3278 не индуцировало высвобождение цитокинов Т-клетками в присутствии CD20-отрицательных клеток SU-DHL-1. Только в присутствии клеток-мишеней Raji основное антитело W3278 было способно индуцировать более низкие уровни высвобождения цитокинов, чем ВМК4. Кроме того, антитело W3278 вызывало большее окно EC₅₀ (показано как соотношение EC₅₀ высвобождения цитокинов к уничтожению клеток), чем ВМК4 (таблица 6).

Таблица 6. EC₅₀ высвобождения цитокинов CD4⁺ Т-клетками, опосредованного BsAb, и максимальные уровни, а также соотношения EC₅₀ высвобождения цитокинов к уничтожению клеток Raji

Антитело	TNF- α		IL-2		Соотношение EC ₅₀ высвобождения TNF α /уничтожения клеток Raji	Соотношение EC ₅₀ высвобождения IL-2/уничтожения клеток Raji
	EC ₅₀ (пМ)	Максимальный уровень (нг/мл)	EC ₅₀ (пМ)	Максимальный уровень (нг/мл)		
WBP327-ВМК4.uIgG4	131,4	1,3	113,6	11,8	6 (131,4 пМ/21,49 пМ)	5 (113,6 пМ/21,49 пМ)
W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4.SP	13,5	0,9	11,4	7,7	26 (13,5 пМ/0,52 пМ)	22 (11,4 пМ/0,52 пМ)

5. Тестирование стабильности в сыворотке

Антитело смешивали со свежесобранной человеческой сывороткой и обеспечивали долю сыворотки в смешанном образце более 95 %. Смешанный образец аликвотировали и инкубировали при 37 °С в течение 0-14 дней. В каждый момент времени, как показано на фиг. 7, образцы быстро замораживали в жидком азоте и хранили при минус 80 °С перед анализом. Связывание каждого образца с клетками Raji или Jurkat анализировали с помощью FACS.

Как показано на фиг. 7, антитело W3278, обработанное человеческой сывороткой, связывалось как с клетками Jurkat (фиг. 7A), так и с клетками Raji (фиг. 7B) аналогично свежеразмороженному антителу (день 0). Эти результаты указывают на то, что антитело W3278 было стабильным в сыворотке человека в течение по меньшей мере 14 дней (фиг. 7).

6. Анализ ДСФ и тестирование на термическую стабильность

Анализ ДСФ проводили с использованием флуоресцентной количественной ПЦР в реальном времени (QuantStudio 7 Flex, Thermo Fisher Scientific). Вкратце, 19 мкл раствора антитела смешивали с 1 мкл 62,5 X раствора SYPRO Orange (Invitrogen) и смесь добавляли в 96-луночный планшет (Biosystems). Планшет нагревали от 26 до 95 °С со скоростью 2 °С/мин и собирали полученные данные флуоресценции. Рассчитывали отрицательные производные изменений флуоресценции относительно различных температур и определяли максимальное значение как температуру плавления T_h . Если белок имеет несколько переходов с разворачиванием, первые две T_h регистрировали и обозначали как T_{m1} и T_{m2} . T_{m1} всегда интерпретировали как формальную температуру плавления T_m для удобства сравнения между различными белками. Сбор данных и расчет T_h проводили автоматически операционным программным обеспечением (QuantStudio Real-Time PCR PCR Software v1.3). Значения T_{m1} и T_{m2} для антитела W3278 в различных буферах приведены в таблице 7. T_m для W3278 составлял около 61 °С, что свидетельствует о хорошей термической стабильности антитела W3278.

Таблица 7. Термическая стабильность, измеренная с помощью ДСФ (значения T_m обозначены T_{m1} в таблице)

Наименование белка	pI	Буфер	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
W3278-U2T3.F18R-1 .uIgG4.SP	7,42	PBS	61,1	72,6
		20 mM гистидина + 7% сахарозы, pH 6,5	60,3	73,6
		50 mM NaAC + 7% сахарозы pH 5,6	61,0	74,2

Пример 4

Противоопухолевая эффективность *in vivo*

Антитела тестировали на противоопухолевую эффективность *in vivo* в модели МКПК гуманизированной мыши NOG, несущей опухоль Raji. В исследовании использовали самок мышей NOG (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) в возрасте 6-8 недель. Опухолевые клетки Raji (ATCC® CCL-86™) культивировали монослоем в среде 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в инкубаторе при 37 °C с 5 % CO₂. Опухолевые клетки обычно субкультивировали два раза в неделю. Клетки, растущие в фазе экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли. МКПК человека выделяли из гепариновой цельной крови здорового донора с использованием Ficoll-Paque Plus в соответствии с инструкциями производителя.

В качестве модели лечения каждой мыши вводили подкожную совместную инъекцию предварительно смешанных опухолевых клеток Raji ($2,0 \times 10^6$) и МКПК ($3,0 \times 10^6$) в правый верхний бок. Когда средний объем опухоли достигал около 60 мм³, животных рандомизировали в группы и вводили им первые инъекции антител. Для исследования эффективности мыши получали две внутривенные инъекции указанного количества антитела каждую неделю в течение в общей сложности 3 недель. Все процедуры, связанные с обращением с животными, уходом и лечением в исследовании, проводились в соответствии с инструкциями, утвержденными Институциональным комитетом по уходу за животными и использованию (IACUC) WuXi AppTec, с последующим руководством Ассоциации по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными (AAALAC). Для всех исследований опухолей мышей взвешивали и измеряли рост опухоли два раза в неделю с использованием штангенциркулей. Объемы опухоли оценивали как $\frac{1}{2}(\text{длина} \times \text{ширина}^2)$.

Как показано на фиг. 8, лечение основным антителом W3278 продемонстрировало дозозависимую противоопухолевую активность и было более эффективным, чем лечение ВМК4 (фиг. 8А). Мыши имели нормальную массу тела во время эксперимента (фиг. 8В).

Пример 5

Исследование однократной дозы биспецифического антитела WBP3278 у яванских макаков, впервые используемых для иммунизации

Чтобы определить, может ли лечение биспецифическим антителом WBP3278 истощать циркулирующие В-клетки у приматов, и определить, может ли быть вызвана какая-либо неожиданная токсичность, авторы изобретения провели исследовательское

фармакологическое тестирование без соблюдения требований НЛП (надлежащая лабораторная практика) на яванских макаках (*Macaca Fascicularis*). Четыре самца яванских макак (в возрасте 3-4 лет, весом около 4 кг), впервые использованные для иммунизации, были предоставлены Guangdong Zhao Qing Chuang Yao Biotechnology Co., Ltd. Все процедуры, связанные с обращением с животными, уходом и лечением в исследовании, проводились в соответствии с инструкциями, утвержденными Институциональным комитетом по уходу за животными и использованию (IACUC) PharmaLegacy Laboratory, с последующим руководством Ассоциации по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными (AAALAC).

Четырех животных разделили на две группы (по 2 животных на группу) и каждому дали одну дозу основного антитела WBP3278 (то есть, W3278-U2T3.F18R-1.uIgG4, в дальнейшем именуемое как основное антитело WBP3278) в дозе 1 мг/кг (группа 1) и 10 мг/кг (группа 2) путем медленной внутривенной инъекции в течение 60 секунд. Уровни циркулирующих В-клеток и Т-клеток в периферической крови контролировали с помощью FACS в течение 4 недель для следующих лимфоцитов: В-лимфоцитов (CD45+/CD20+), Т-лимфоцитов (CD45+/CD3+), CD4⁺ Т-лимфоцитов (CD4+/CD45+/CD3+) и CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD8+/CD45+/CD3+). Уровни циркулирующих воспалительных цитокинов анализировали с использованием BD™ цитометрического анализа на гранулах (СВА) для набора цитокинов Th1/Th2 приматов, отличных от человека (BD Bioscience, кат. № 557800). Обработка основным антителом WBP3278 приводила к немедленному и полному истощению циркулирующих В-клеток, которое продолжалось по меньшей мере 4 недели (фиг. 9). Уровень циркулирующих Т-клеток также снижался сначала после обработки основным антителом WBP3278 и возвращался к исходному уровню или к немного более высокому уровню через 72 часа и это продолжалось по меньшей мере 4 недели (фиг. 10А). Через 72 ч уровень CD8⁺ Т-клеток повышался (фиг. 10В), и уровень CD4⁺ Т-клеток возвращался к нормальному уровню (фиг. 10С), и оба продолжались по меньшей мере 4 недели. После обработки основным антителом WBP3278 наблюдалось быстрое повышение уровней циркулирующих цитокинов, и все уровни цитокинов возвращались к нормальным уровням через 24 часа (фиг. 11).

Концентрацию основного антитела WBP3278 в сыворотке определяли с помощью ELISA. Вкратце, планшет для ELISA покрывали античеловеческим IgG (SouthernBiotech, #2049-01), а затем добавляли серийные разведения образцов сыворотки. Сигналы связывания обнаруживали с помощью козьего антитела против IgG человека с биотином (SouthernBiotech, #2049-08) и стрептавидина-HRP (Life, #SNN1004). Оптическую плотность измеряли при (450-540) нм с использованием многолуночного планшетного

ридера (SpectraMax[®] M5e). Некомпаратментный фармакокинетический анализ проводили на концентрациях основных антител WBP3278 у яванских макак с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonlin (версия 8.1, Pharsight, Mountain View, CA). При получении ФК параметров применяли линейный/логарифмический метод касательных. Отдельные значения BLQ (ниже предела количественного определения) были исключены при расчете средних концентраций. При расчете всех фармакокинетических параметров использовались нормальные уровни доз и количество номинальных выборок. Сводная информация о ФК параметрах приведена в Таблице 8 и показана на Фиг. 12. Можно видеть, что при увеличении дозы от 1 до 10 мг/кг системное воздействие C_0 увеличивалось от 19,9 до 282 мкг/мл (приблизительно в 14 раз), а AUC_{0-last} увеличивалась от 259 до 5788 мкг.ч/мл (приблизительно в 22 раза). Период полужизни в сыворотке ($T_{1/2}$) биспецифического антитела WBP3278 составлял 43,3 ч и 89,8 ч при 1 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно.

Таблица 8. Обзор фармакокинетических параметров основного антитела WBP3278

ФК параметры	1 мг/кг (среднее)	10 мг/кг (среднее)
C_0 (мкг/мл)	19,9	282
$T_{1/2}$ (ч)	43,3	89,8
AUC_{0-last} (мкг.ч/мл)	259	5788

Кроме того, наблюдения у клетки во время эксперимента показали, что неожиданная токсичность не наблюдалась как для высоких, так и для низких уровней доз основного антитела WBP3278 (данные не показаны).

Результаты эксперимента показывают, что основное антитело WBP3278 может эффективно элиминировать В-клетки *in vivo*, не вызывая нежелательных явлений, таких как цитокиновые штормы, и имеет достаточный период полужизни у яванских макак. Эти экспериментальные результаты подтверждают успех доклинической разработки лекарственного средства на основе основного антитела WBP3278.

Примеры композиций

Эксклюзионная хроматография-высокоэффективная жидкостная хроматография (SEC-HPLC): для определения чистоты антитела в образце. В примере 6 использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1260 и колонку для гель-хроматографии TSK G3000SWXL (TOSOH); элюирование проводили с использованием 50 мМ фосфатно-солевого буферного раствора + 300 мМ буфера на основе хлорида натрия (рН 6,8) в качестве подвижной фазы, и длина волны обнаружения

составляла 280 нм. В примерах 7, 8.1, 8.2 и 10 применяли высокоэффективный жидкостный хроматограф Waters I-Class и колонку для гель-хроматографии Agilent AdvanceBio SEC 200Å; элюирование проводили с использованием 17,8 мМ дигидрофосфата натрия + 32,2 мМ динатрия гидрофосфата + 200 мМ L-аргинин гидрохлоридного буфера в качестве подвижной фазы, и длина волны обнаружения составляла 280 нм. Содержания высших полимеров, основные пики и фрагменты разложения рассчитывали в процентах с использованием метода нормализации площади.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК): В примерах 6-7 начальную температуру (T_{monset}) и температуру разворачивания (T_m) образца анализировали с использованием SYS12907 (Malvern). Образец разбавляли до концентрации 1 мг/мл, и программа была следующей: начальная температура сканирования составляла 10 °C, конечная температура сканирования составляла 95 °C, и температуру повышали со скоростью 200 °C/ч. В примере 10 температуру начала (T_{monset}) и температуру плавления (T_m) образца анализировали с использованием анализатора стабильности белка PrometheusNT.48 (NanoTemper). 10 мкл образца помещали в камеру для образцов, и программа была следующей: начальная температура сканирования составляла 25 °C, конечная температура сканирования составляла 95 °C, и температуру повышали со скоростью 0,3 °C/ч.

В примере 6 температуру агрегации (T_{agg}) образца определяли с использованием dynaproplateReaderII (Wyatt). 20 мкл образца добавляли в 384-луночный планшет для образцов и 20 мкл парафинового масла добавляли в образец. Затем 384-луночный планшет для образцов центрифугировали для удаления пузырьков воздуха. Программа была следующей: программа нагрева была от 25 до 60 °C, время сканирования составляло 5 секунд, и было выполнено 5 сканирований. В примере 10 температуру агрегации (T_{agg}) образца определяли с использованием DynaproplateReader III (Wyatt). 30 мкл образца добавляли в 384-луночный планшет для образцов и планшет герметизировали с помощью герметизирующей пленки. Затем 384-луночный планшет для образцов центрифугировали для удаления пузырьков воздуха. Программа была следующей: программа нагрева была от 25 до 85 °C, время сканирования составляло 5 секунд, и было выполнено 5 сканирований.

Модулированная дифференциальная сканирующая калориметрия (мДСК): Температуру стеклования (T_g') образца во время лиофилизации анализировали с использованием DSC Q2000 (TA Instruments), и программа была следующей: температуру снижали до минус 60 °C, выдерживали в течение 5 минут и увеличивали до 20 °C со скоростью 5 °C/мин.

Количество нерастворимых частиц анализировали с использованием детектора

частиц GWJ-8 (Tianjin Tianda Tianfa GWJ-8 Technology Co., Ltd.). Количество MFI частиц анализировали с использованием анализатора частиц с микропотоковой визуализацией MFI5100 (ProteinSimple), и данные анализировали с использованием программного обеспечения MVAS, поставляемого с системой.

Содержание воды в образце измеряли с использованием титратора содержания воды C30 (METTLER TOLEDO).

Внешний вид: колбу для образцов протирали начисто, а затем помещали под детектор прозрачности. Освещенность доводили до 1500 лк (люкс). Раствор визуально осматривали с точки зрения внешнего вида и видимых посторонних веществ на черном фоне и белом фоне.

Пример 6

Буферная система и значение pH

Основное антитело WBP3278 заменяли на целевой буфер путем диализа с концентрацией белка 2 мг/мл. Фильтрацию проводили с использованием фильтрующей мембраны из PVDF (поливинилиденфторид) с диаметром пор 0,22 мкм в шкафу для биобезопасности, и фильтрат аликвотировали во флаконы объемом 2 мл в концентрации 2 мг/мл/флакон. Флаконы закрывали пробками и крышками. Тестирования стабильности проводили при 35 °C, и измерения T_m , T_{agg} и SEC-HPLC показаны в таблице 9, таблице 10 и таблице 11, соответственно.

Таблица 9. Измерения T_m

Образец	T_{mOnset} (°C)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 5,0	49,4	57,8	64,4	75,6
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 5,5	53,1	62,3	75,5	-
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 6,0	55,1	64,4	75,3	-
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 6,5	56,0	65,1	75,2	-
10 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 6,0	55,2	64,2	75,0	-
20 mM гистидин- гидрохлорид гистидина, pH 5,5	49,9	58,9	65,1	77,1
20 mM гистидин- гидрохлорид гистидина, pH 6,0	52,4	61,8	77,0	-
20 mM гистидин- гидрохлорид гистидина, pH 6,5	53,0	62,2	75,4	-

Примечание: «-» означает необнаруживаемый.

Таблица 10. Измерения T_{agg}

Образец	SLS	DLS

	(статическое рассеяние света) (°C)	(динамическое рассеяние света) (°C)
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 5,0	40,87	40,30
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 5,5	45,63	40,34
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 6,0	38,48	39,93
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 6,5	40,15	41,01
10 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 6,0	49,55	47,81
20 mM гистидин- гидрохлорид гистидина, pH 5,5	41,49	41,04
20 mM гистидин- гидрохлорид гистидина, pH 6,0	37,63	37,69
20 mM гистидин- гидрохлорид гистидина, pH 6,5	36,54	39,55

Таблица 11. Измерения методом эксклюзионной ВЭЖХ (SEC-HPLC)

Образец	Точки пробоотбора	SEC-HPLC		
		Высший полимер %	Основной пик %	Фрагмент %
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 5,0	T0	0,8	99,2	H/O
	35 °C в течение 1 недели	8,2	91,8	H/O
	35 °C в течение 2 недель	10,4	89,6	H/O
	35 °C в течение 4 недель	17,9 (+17,1)	80,3	1,6
20 mM лимонная кислота-цитрат натрия, pH 5,5	T0	2,1	97,9	H/O
	35 °C в течение 1 недели	3,0	97,0	H/O
	35 °C в течение 2 недель	2,8	97,2	H/O
	35 °C в течение 4 недель	3,8 (+1,7)	96,2	H/O
20 mM лимонная	T0	0,9	99,1	H/O

кислота-цитрат натрия, рН 6,0	35 °С в течение 1 недели	1,3	98,7	Н/О
	35 °С в течение 2 недель	1,4	98,6	Н/О
	35 °С в течение 4 недель	1,5 (+0,6)	98,5	Н/О
20 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,5	Т0	0,9	99,1	Н/О
	35 °С в течение 1 недели	0,9	99,1	Н/О
	35 °С в течение 2 недель	1,0	99,0	Н/О
	35 °С в течение 4 недель	1,3 (+0,4)	98,6	0,1
10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,0	Т0	0,5	99,5	Н/О
	35 °С в течение 1 недели	0,8	99,2	Н/О
	35 °С в течение 2 недель	0,8	99,2	Н/О
	35 °С в течение 4 недель	1,1 (+0,6)	98,9	Н/О
20 мМ гистидин-гидрохлорид гистидина, рН 5,5	Т0	1,4	98,6	Н/О
	35 °С в течение 1 недели	3,2	96,8	Н/О
	35 °С в течение 2 недель	3,9	96,1	Н/О
	35 °С в течение 4 недель	4,9 (+3,5)	95,1	Н/О
20 мМ гистидин-гидрохлорид гистидина, рН 6,0	Т0	0,4	99,6	Н/О
	35 °С в течение 1 недели	1,1	98,9	Н/О
	35 °С в течение 2	1,5	98,5	Н/О

	неделя			
	35 °C в течение 4 неделя	2,3 (+1,9)	97,7	Н/О
20 mM гистидин-гидрохлорид гистидина, рН 6,5	T0	0,2	99,8	Н/О
	35 °C в течение 1 недели	0,9	99,1	Н/О
	35 °C в течение 2 неделя	1,2	98,8	Н/О
	35 °C в течение 4 неделя	1,6 (+1,4)	98,4	Н/О

Примечание: «T0» представляет собой время 0; «Н/О» означает необнаруживаемый; (+X) представляет собой увеличение X относительно T0, и (-X) представляет собой уменьшение X относительно T0; например, высший полимер = 17,9 (+17,1) означает высший полимер (17,9 %) с увеличением 17,1 % относительно T0.

Пример 7

Сахар и поверхностно-активное вещество

1 кг 10 mM буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия (рН 6,2) получали следующим образом: 0,282 г моногидрата лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 2,547 г дигидрата цитрата натрия ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) взвешивали и добавляли воду до тех пор, пока буфер не достигнул 1 кг, и буфер фильтровали.

Основное антитело WBP3278 заменяли на 10 mM буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия, полученного выше, путем диализа. Добавляли маточный раствор сахарозы, маточный раствор дигидрата трегалозы или маточный раствор маннита и добавляли маточный раствор твина 80 для получения целевой композиции с концентрацией белка 2 мг/мл, которую затем фильтровали через фильтрующую мембрану из PVDF с диаметром пор 0,22 мкм в шкафу для биобезопасности и аликвотировали во флаконы объемом 4 мл с концентрацией 2 мг/мл/флакон. Флаконы закрывали пробками и крышками. 8 мас./об.% сахароза относится к 80 мг/мл сахарозы; 8,8 мас./об.% дигидрата трегалозы относится к 88 мг/мл дигидрата трегалозы; 0,02 мас./об.% твина 80 относится к 0,2 мг/мл твина 80. Измерения T_m и измерения SEC-HPLC и рН трех композиций показаны в таблице 12 и таблице 13, соответственно.

Таблица 12. Измерения T_m

Образец	T_{mOnset} (°C)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
---------	-------------------	------------------	------------------

2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 8 мас./об.% сахара, 0,02 мас./об.% твин 80	56,7	65,5	76,5
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 8,8 мас./об.% дигидрат трегалозы, 0,02 мас./об.% твин 80	56,8	65,7	76,7
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 2 мас./об.% сахара, 4 мас./об.% маннит, 0,02 мас./об.% твин 80	57,5	65,6	76,6

Таблица 13. Измерения SEC-HPLC и pH

Образец	Точки пробоотбора	SEC-HPLC			pH
		Высший полимер %	Основной пик %	Фрагмент %	
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 8 мас./об.% сахара, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	1,9	97,5	0,6	6,2
	40 °C в течение 2 недель	3,1	95,9	1,0	6,2
	40 °C в течение 4 недель	4,8 (+2,9)	93,9 (-3,6)	1,3	6,2
	3 цикла замораживания и размораживания	2,2	97,3	0,4	6,2
	5 циклов замораживания и размораживания	1,9	97,7	0,4	6,2
	1 день встряхивания	1,9	97,6	0,5	6,2
	3 дня	1,8	97,7	0,5	6,2

	встряхивания				
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 8,8 мас./об.% дигидрат трегалозы, 0,02 мас./об.% твин 80	Т0	1,9	97,5	0,6	6,2
	40 °С в течение 2 недель	3,1	96,0	0,9	6,2
	40 °С в течение 4 недель	4,8 (+2,9)	93,8 (-3,7)	1,3	6,2
	3 цикла замораживания и размораживания	2,1	97,4	0,4	6,2
	5 циклов замораживания и размораживания	1,9	97,6	0,5	6,2
	1 день встряхивания	1,9	97,5	0,6	6,2
	3 дня встряхивания	1,7	97,7	0,5	6,2
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 2 мас./об.% сахароза, 4 мас./об.% маннит, 0,02 мас./об.% твин 80	Т0	1,8	97,6	0,6	6,2
	40 °С в течение 2 недель	3,1	96,0	0,9	6,2
	40 °С в течение 4 недель	4,9 (+3,1)	93,8 (-3,8)	1,3	6,2
	3 цикла замораживания и размораживания	2,0	97,6	0,4	6,2

	5 циклов заморажива ния и разморажива ния	1,9	97,7	0,5	6,2
	1 день встряхивания	1,8	97,7	0,5	6,2
	3 дня встряхивания	1,7	97,7	0,5	6,2

Примечание: «T₀» представляет собой время 0; замораживание и оттаивание проводили при минус 70 °С до комнатной температуры.

Пример 8.1

Сахар и поверхностно-активное вещество

Основное антитело WBP3278 заменяли на 10 мМ буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия (полученный в соответствии со способом получения, показанным в Примере 7) путем диализа. Добавляли маточный раствор сахарозы, маточный раствор дигидрата трегалозы или маточный раствор маннита и добавляли маточный раствор твина 80 для получения целевой композиции с концентрацией белка 2 мг/мл, которую затем фильтровали через фильтрующую мембрану из PVDF с диаметром пор 0,22 мкм в шкафу для биобезопасности и аликвотировали во флаконы объемом 4 мл с концентрацией 2 мг/мл/флакон. Флаконы наполовину закрывали пробкой, а затем помещали в лиофилизатор для лиофилизации. Программа лиофилизации была следующей: предварительное замораживание, первичная сушка и вторичная сушка. Процедура, например, показана в Таблице 14. Три композиции восстанавливали из воды, и внешний вид, время восстановления и содержание воды в восстановленных составах приведены в таблице 15. Измерения Tg' и SEC-HPLC показаны в таблице 16 и таблице 17, соответственно.

Таблица 14. Процедура лиофилизации

Программа		Температура полки (°С)	Скорость (°С/мин)	Время выдерживания (мин)	Давление в шкафу (мбар)
Предварительное замораживание	1	5	1	30	Атмосферное давление
	2	минус 5	1	30	Атмосферное давление

	3	минус 45	1	60	Атмосферное давление
	4	минус 22	1	180	Атмосферное давление
	5	минус 45	1	90	Атмосферное давление
Первичная сушка	6	минус 33	1	80	0,1
	7	минус 28	1	1410	0,1
Вторичная сушка	8	35	0,3	240	0,1

Таблица 15. Тестирование внешнего вида, времени восстановления и содержания воды в восстановленных лиофилизированных составах

Образец	Точки пробоотбора	Внешний вид после восстановления	Время восстановления	Содержание воды %
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 8 мас./об.% сахара, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	28 с	1,1
	40 °C в течение 2 недель		34 с	1,1
	40 °C в течение 4 недель		23 с	1,0
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 8,8 мас./об.% дигидрат трегалозы, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	31 с	0,7
	40 °C в течение 2 недель		22 с	0,8
	40 °C в течение 4 недель		36 с	0,4
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 2 мас./об.% сахара, 4 мас./об.% маннит, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	2 мин 10 с	1,2

	40 °C в течение 2 недель	Бесцветный, слегка опалесцирующий и без видимых посторонних веществ	1 мин 26 с	1,2
	40 °C в течение 4 недель	Бесцветный, слегка опалесцирующий и без видимых посторонних веществ	2 мин 01 с	1,1

Примечание: «Т0» представляет собой время 0.

Таблица 16. Измерения Tg'

Образец	Tg'(°C)
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 mM лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 8 мас./об.% сахара, 0,02 мас./об.% твин 80	минус 34,4
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 mM лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 8,8 мас./об.% дигидрат трегалозы, 0,02 мас./об.% твин 80	минус 31,8
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 mM лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 2 мас./об.% сахара, 4 мас./об.% маннит, 0,02 мас./об.% твин 80	минус 36,5

Таблица 17. Измерения SEC-HPLC и pH

Образец	Точки пробоотбора	SEC-HPLC			pH
		Высший полимер %	Основной пик %	Фрагмент %	
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 mM лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 8 мас./об.% сахара, 0,02	Т0	1,9	97,6	0,6	6,2
	40 °C в течение 2 недель	2,1	97,5	0,4	6,2

мас./об.% твин 80	40 °С в течение 4 недель	2,1	97,4	0,4	6,2
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 8,8 мас./об.% дигидрат трегалозы, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	1,9	97,6	0,6	6,2
	40 °С в течение 2 недель	2,1	97,5	0,4	6,2
	40 °С в течение 4 недель	2,3	97,2	0,4	6,2
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 2 мас./об.% сахара, 4 мас./об.% маннит, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	2,2	97,2	0,6	6,2
	40 °С в течение 2 недель	2,9	96,7	0,4	6,2
	40 °С в течение 4 недель	3,1	96,5	0,4	6,2

Примечание: «T0» представляет собой время 0.

Пример 8.2

Сахар и поверхностно-активное вещество

Основное антитело WBP3278 заменяли на 10 мМ буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия (полученный в соответствии со способом получения, показанным в Примере 7) путем ультрафильтрации. Добавляли маточный раствор сахарозы или маточный раствор дигидрата трегалозы и добавляли маточный раствор твина 80 для получения целевой композиции с концентрацией белка 2 мг/мл, которую затем подвергали двухступенчатой фильтрации через фильтрующую мембрану из PVDF с диаметром пор 0,22 мкм и аликвотировали во флаконы объемом 6 мл с концентрацией 2 мг/мл/флакон. Флаконы наполовину закрывали пробкой, а затем помещали в лиофилизатор для лиофилизации. Процедура показана, например, в Таблице 14. Измерения SEC-HPLC двух составов приведены в таблице 18. Кроме того, MFI частиц и нерастворимые частицы в обоих составах находились в нормальном диапазоне, но MFI частиц (в диапазоне $2 \leq X < 5$ мкм) в сахарозосодержащем составе намного больше, чем в трегалозосодержащем составе, и нерастворимых частиц (в диапазоне $2 \leq X < 5$ мкм) в

сахарозосодержащем составе также немного больше, чем в трегалозосодержащем составе. После хранения при 40 °С в течение 4 недель, при 25 °С в течение 6 месяцев и при 2-8 °С в течение 6 месяцев ни один из составов не продемонстрировал значительных изменений в частицах.

Таблица 18. Измерения методом SEC-HPLC

Образец	Точки пробоотбора	SEC-HPLC			pH
		Высший полимер %	Основной пик %	Фрагмент %	
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 8 мас./об.% сахара, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	1,9	95,1	2,9	6,2
	40 °С в течение 2 недель	2,0	95,1	2,8	6,2
	40 °С в течение 4 недель	2,1	94,8	3,1	6,2
	25 °С в течение 1 месяца	2,2	94,7	3,2	6,2
	25 °С в течение 6 месяцев	2,1	94,8	3,1	6,2
	2-8 °С в течение 1 месяца	2,1	94,7	3,2	6,2
	2-8 °С в течение 6 месяцев	1,9	95,0	3,0	6,2
2 мг/мл основное антитело WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия pH 6,2, 8,8 мас./об.% дигидрат трегалозы, 0,02 мас./об.% твин 80	T0	2,1	95,1	2,8	6,2
	40 °С в течение 2 недель	2,4	94,6	3,0	6,2
	40 °С в течение 4 недель	2,4	94,4	3,2	6,2
	25 °С в течение 1 месяца	2,2	94,6	3,2	6,2
	25 °С в течение 6 месяцев	2,2	94,7	3,1	6,2
	2-8 °С в течение 1 месяца	2,1	94,6	3,3	6,2
	2-8 °С в течение 6 месяцев	2,0	95,0	3,0	6,2

Примечание: «T0» представляет собой время 0.

Пример 9

Биологическая активность

Анализы биологической активности проводили с помощью экспериментов по активации Т-клеток *in vitro*. Клетки Raji (линии CD3- и CD20+ В-клеток человека) использовали в качестве клеток-мишеней, а сконструированные клетки Jurkat, экспрессирующие люциферазу (линии CD3+ и CD20- Т-клеток человека) использовали в качестве эффекторных клеток. Когда CD3-связывающая часть и CD20-связывающая часть основного антитела WBP3278 связываются с клетками Raji и клетками Jurkat, соответственно, клетки Jurkat будут активированы и будет вызвана нисходящая трансдукция сигнала, что приведет к экспрессии люциферазы. Сигналы флуоресценции детектировали детектирующим реагентом Bio-Glo. Референсный образец (образец композиции из серии, представляющей процесс) и тестируемый образец (образец композиции, подлежащий испытанию) разбавляли градиентным разбавлением (4-кратное градиентное разбавление от начальной концентрации 9000 нг/мл, в общей сложности 11 градиентов разбавления), а затем разбавления добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток при 25 мкл/лунку. Клетки Raji и клетки Jurkat, растущие в логарифмической фазе, доводили до 2×10^6 клеток/мл, смешивали в равном объеме и добавляли в вышеуказанный 96-луночный планшет для культивирования клеток при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали в клеточном инкубаторе с диоксидом углерода при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 4-5 часов. Добавляли реагент Bio-Lite Luciferase при 75 мкл/лунку и планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 3-5 минут. Значения RLU (относительная единица люминесценции) считывали с помощью модуля хемилюминесцентного детектирования многофункционального планшетного ридера.

Биологическая активность тестируемого образца (%) = (значение EC₅₀ референсного образца / значение EC₅₀ тестируемого образца) × 100 %

Экспериментальные результаты показывают, что основное антитело WBP3278 в лиофилизированном составе все еще сохраняло хорошую биологическую активность после хранения при 40 °C в течение 4 недель, при 25 °C в течение 6 месяцев и при 2-8 °C в течение 6 месяцев.

Таблица 19. Результаты анализа биологической активности

Образец	Точки пробоотбора	Биологическая активность (%)
Лиофилизированный состав, содержащий 2 мг/мл основного	T0	114
	40 °C в течение 2	110

антитела WBP3278, 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия рН 6,2, 8,8 мас./об.% дигидрата трегалозы, 0,02 мас./об.% твина 80	неделя	
	40 °С в течение 4 недель	96
	25 °С в течение 1 месяца	105
	25 °С в течение 6 месяцев	109
	2-8 °С в течение 1 месяца	103
	2-8 °С в течение 6 месяцев	108

Примечание: «Т0» представляет собой время 0.

Пример 10

Основное антитело WBP3278 заменяли на буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия (полученный в соответствии со способом получения, показанным в Примере 7) путем ультрафильтрации. Добавляли маточный раствор регулятора осмотического давления и/или стабилизатора и добавляли маточный раствор твина 80 для получения целевого состава (как показано в таблице 20), который затем подвергали двухступенчатой фильтрации через фильтрующую мембрану из PVDF с диаметром пор 0,22 мкм и аликвотировали в цилиндрические флаконы для инъекций из нейтрального боросиликатного стекла объемом 6 мл с концентрацией 1 мл/флакон. Флаконы закрывали пробками и крышками. Измерения T_m и T_{agg} различных составов показаны в таблице 21. Исследования внешнего вида и SEC-HPLC приведены в таблице 22. Кроме того, биологическая активность всех составов находится в пределах нормального диапазона (см. Пример 9 для способа анализа).

Таблица 20. Компоненты композиций

№	Концентрация белка	Буфер	Поверхностно-активное вещество	Регулятор	Регулятор
				осмотического давления и/или стабилизатор	осмотического давления и/или стабилизатор

F5-1	2 мг/мл	10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,2	0,02 мас/об.% Полисорбат 80	8,8 мас/об.% дигидрат трегалозы	/
F5-2	5 мг/мл	10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,0			6 мг/мл Хлорид натрия
F5-3		10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,0			100 ммоль/л Аргинина гидрохлорид
F5-4		20 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,0			/
F5-5	10 мг/мл	10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,0			6 мг/мл Хлорид натрия
F5-6		10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,0			100 ммоль/л Аргинина гидрохлорид
F5-7		20 мМ лимонная кислота-цитрат натрия, рН 6,0			/

Примечание: / не представляет ничего.

Таблица 21. Измерения T_m и T_{agg}

№	T_m (°C)			T_{agg} (°C)	
	T_{mOnset}	T_{m1}	T_{m2}	DLS	SLS
F5-1	53,2	59,3	71,3	51,6	51,5
F5-2	52,9	59,4	71,7	51,6	51,6
F5-3	51,8	58,7	71,9	51,0	51,2
F5-4	53,4	59,6	71,4	51,3	51,5
F5-5	53,0	59,4	71,4	51,2	50,3
F5-6	52,1	58,6	71,5	51,0	50,8
F5-7	53,5	59,4	71,5	51,0	51,4

Таблица 22. Измерения внешнего вида и SEC-HPLC

№	Точки пробоотбора	Внешний вид	SEC-HPLC	
			Высший полимер (%)	Основной пик (%)
F5-1	День 0	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	1,71	95,67
	40 °С в течение 2 недель		1,88	95,99
	40 °С в течение 4 недель		2,56	92,27
	2-8 °С в течение 1 месяца		\	\
	2-8 °С в течение 3 месяцев		\	\
	2-8 °С в течение 6 месяцев		\	\
F5-2	День 0	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	2,49	95,16
	40 °С в течение 2 недель	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	2,21	95,90
	40 °С в течение 4 недель	Бесцветный, прозрачный, 1 частица	3,11	91,89
	2-8 °С в течение 1 месяца	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	\	\
	2-8 °С в течение 3 месяцев	Бесцветный, прозрачный и без	\	\

№	Точки пробоотбора	Внешний вид	SEC-HPLC	
			Высший полимер (%)	Основной пик (%)
	месяцев	видимых посторонних веществ		
	2-8 °С в течение 6 месяцев	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	\	\
F5-3	День 0	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	2,36	95,31
	40 °С в течение 2 недель	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	2,26	95,81
	40 °С в течение 4 недель	Бесцветный, прозрачный, 1 частица	3,57	91,39
	2-8 °С в течение 1 месяца	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	\	\
	2-8 °С в течение 3 месяцев	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	\	\
	2-8 °С в течение 6 месяцев	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	\	\
	F5-4	День 0	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних	2,36

№	Точки пробоотбора	Внешний вид	SEC-HPLC	
			Высший полимер (%)	Основной пик (%)
		веществ		
	40 °С в течение 2 недель	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	2,22	95,74
	40 °С в течение 4 недель	Бесцветный, прозрачный, 1 частица	3,12	91,77
	2-8 °С в течение 1 месяца	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	\	\
	2-8 °С в течение 3 месяцев	Бесцветный, прозрачный и без видимых посторонних веществ	\	\
	2-8 °С в течение 6 месяцев	Бесцветный, слегка опалесцирующий, с небольшим количеством частиц	\	\

Примечание: «\» означает отсутствие обнаружения.

Специалистам в данной области техники также должно быть понятно, что настоящее изобретение может быть реализовано в других конкретных формах без отступления от его сущности или ключевых атрибутов. В приведенном выше описании настоящее изобретение раскрывает только иллюстративные варианты осуществления, и следует понимать, что другие варианты также включены в объем настоящего изобретения. Соответственно, настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, подробно описанными в настоящем документе. Скорее, для объема и содержания настоящего изобретения следует сделать ссылку на прилагаемую формулу изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция, содержащая биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс и буфер, включающий один или комбинацию нескольких из буфера на основе соли гистидина, сукцинатного буфера и цитратного буфера.

2. Жидкая композиция по п. 1, где буфер включает один или более из буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина, буфера на основе янтарной кислоты и сукцината натрия и буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия; предпочтительно буфер представляет собой буфер на основе лимонной кислоты и цитрата натрия.

3. Жидкая композиция по п. 1 или п. 2, где буфер имеет концентрацию от около 1 до около 30 мМ, предпочтительно от около 5 до около 20 мМ и более предпочтительно около 10 мМ.

4. Жидкая композиция по любому из пп. 1-3, где биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс присутствует в концентрации от около 0,1 до около 50 мг/мл, предпочтительно от около 0,5 до 20 мг/мл или от около 1 до около 20 мг/мл, более предпочтительно от около 2 до около 10 мг/мл или от около 2 до около 5 мг/мл.

5. Жидкая композиция по любому из пп. 1-4, которая имеет рН от около 5,0 до около 7,5 или от около 5,0 до около 6,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5 и более предпочтительно около 6, около 6,1 или около 6,2.

6. Жидкая композиция по любому из пп. 1-5, дополнительно содержащая регулятор осмотического давления и/или стабилизатор;

предпочтительно регулятор осмотического давления и/или стабилизатор содержит сахарид;

более предпочтительно указанный сахарид представляет собой трегалозу или сахарозу;

наиболее предпочтительно указанный сахарид представляет собой трегалозу.

7. Жидкая композиция по п. 6, где сахарид присутствует в концентрации от 150 до около 320 мМ, предпочтительно от около 180 до около 265 мМ, от около 230 до около 240 мМ или от около 230 до около 235 мМ, более предпочтительно около 233 мМ или около 232,6 мМ.

8. Жидкая композиция по п. 6, где регулятор осмотического давления и/или стабилизатор дополнительно содержит один или более из хлорида натрия, аргинин гидрохлорида, глицина и пролина;

предпочтительно хлорид натрия, аргинин гидрохлорид, глицин или пролин

присутствует в концентрации от около 10 до около 300 мМ, предпочтительно от около 20 до около 200 мМ или от около 50 до около 150 мМ, более предпочтительно от около 100 до около 110 мМ или от около 100 до около 105 мМ.

9. Жидкая композиция по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество;

предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20, предпочтительно полисорбат 80;

предпочтительно поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001 до около 0,1 мас./об.%, предпочтительно от около 0,005 до около 0,08 мас./об.%, или от около 0,01 до около 0,04 мас./об.%, более предпочтительно около 0,02 мас./об.%.

10. Жидкая композиция по любому из пп. 1-9, содержащая:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буфера,

(c) от около 150 до около 320 мМ сахара; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от около 10 до около 300 мМ глицина и от около 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% поверхностно-активного вещества,

где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5;

необязательно, жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буфера,

(c) от около 150 до около 320 мМ трегалозы; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от около 10 до около 300 мМ глицина и от около 10 до около 300 мМ пролина; и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80,

где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5;

необязательно, жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20

полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буфера,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, от около 20 до около 200 мМ глицина и от около 20 до около 200 мМ пролина; и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80,

где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5;

необязательно, жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы; необязательно может содержаться одно или более из следующего: от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, от около 20 до около 200 мМ глицина и от около 20 до около 200 мМ пролина; и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80,

где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

11. Жидкая композиция по любому из пп. 1-9, содержащая:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина или буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) от около 150 до около 320 мМ сахара и одно или более из следующего: от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, от около 10 до около 300 мМ аргинин гидрохлорида, от около 10 до около 300 мМ глицина и от около 10 до около 300 мМ пролина, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% поверхностно-активного вещества,

где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5;

необязательно, жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20

полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ буфера на основе гистидина и гидрохлорида гистидина или буфера на основе лимонной кислоты и цитрата натрия,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы или сахарозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия и/или от около 20 до около 200 мМ аргинин гидрохлорида, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 20 или полисорбата 80, где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5;

необязательно, жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,1 до около 50 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 1 до около 30 мМ цитратного буфера,

(c) от около 150 до около 320 мМ трегалозы и от около 10 до около 300 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,001 до около 0,1 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5;

необязательно, жидкая композиция содержит:

(a) от около 0,5 до около 20 мг/мл биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса,

(b) от около 5 до около 20 мМ цитратного буфера,

(c) от около 180 до около 265 мМ трегалозы и от около 20 до около 200 мМ хлорида натрия, и

(d) от около 0,005 до около 0,08 мас./об.% полисорбата 80 или полисорбата 20, где указанная жидкая композиция имеет рН от около 5,0 до около 7,5, предпочтительно от около 6,0 до около 6,5.

12. Лиофилизат, содержащий биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, где указанный лиофилизат получают путем лиофилизации жидкой композиции по любому из пп. 1-11; или

указанный лиофилизат способен образовывать жидкую композицию по любому из пп. 1-11 при восстановлении.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс, где указанная фармацевтическая композиция представляет собой раствор, полученный путем восстановления лиофилизата по п. 12.

14. Жидкая композиция по любому из пп. 1-11, лиофилизат по п. 12 или

фармацевтическая композиция по п. 13, где биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит первую антигенсвязывающую часть, связанную со второй антигенсвязывающей частью, где:

первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий, от N-конца к С-концу, первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) Т-клеточного рецептора (TCR), и

второй полипептид, содержащий, от N-конца к С-концу, первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR,

где:

C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C1 и C2, и указанная ненативная межцепочечная связь способна стабилизировать указанный димер, и

вторая антигенсвязывающая часть содержит:

второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) второго антитела, функционально связанный с доменом CH1 тяжелой цепи антитела, и

второй переменный домен легкой цепи (VL2) второго антитела, функционально связанный с константным доменом легкой цепи (CL) антитела,

где:

одна из первой антигенсвязывающей части и второй антигенсвязывающей части представляет собой анти-CD3 связывающую часть, и другая из них представляет собой анти-CD20 связывающую часть;

указанная анти-CD3 связывающая часть получена из анти-CD3 антитела, содержащего:

a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 13,

b) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 14,

c) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 15,

d) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 16,

e) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 17, и

f) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 18,

указанная анти-CD20 связывающая часть получена из анти-CD20 антитела, содержащего:

a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 19,

b) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 20,

c) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 21,

d) CDR1 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 22,

e) CDR2 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11 и 23, и

f) CDR3 к-легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 24.

15. Жидкая композиция, лиофилизат или фармацевтическая композиция по п. 14, где

анти-CD3 связывающая часть биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса содержит: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 27, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26 и 28; или содержит: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 27, с С-концевыми делециями аминокислот SS, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26 и 28;

анти-CD20 связывающая часть биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса содержит: последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29 и 31, и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 32.

16. Жидкая композиция, лиофилизат или фармацевтическая композиция по п. 14 или п. 15, где в биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе первая

антигенсвязывающая часть соединена с первым доменом димеризации, вторая антигенсвязывающая часть соединена со вторым доменом димеризации, и указанные первый домен димеризации и второй домен димеризации связаны;

необязательно, связывание в биспецифическом анти-CD3/CD20 полипептидном комплексе достигается посредством линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика или гидрофобно-гидрофильного взаимодействия, или их комбинации;

необязательно, первый домен димеризации и второй домен димеризации биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса являются различными и связаны таким образом, который препятствует гомодимеризации и/или способствует гетеродимеризации;

необязательно, первый домен димеризации и второй домен димеризации биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса могут быть связаны с образованием гетеродимера посредством принципа «выступы-во-впадины», гидрофобного взаимодействия, электростатического взаимодействия, гидрофильного взаимодействия или повышенной гибкости.

17. Жидкая композиция, лиофилизат или фармацевтическая композиция по п. 16, где первый домен димеризации и/или второй домен димеризации биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса содержит по меньшей мере часть шарнирной области антитела, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4;

необязательно, первый домен димеризации и/или второй домен димеризации биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса содержит домен CH2 антитела и/или домен CH3 антитела;

необязательно, первый домен димеризации биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса функционально связан с первой константной областью (C1) TCR в третьем соединительном домене;

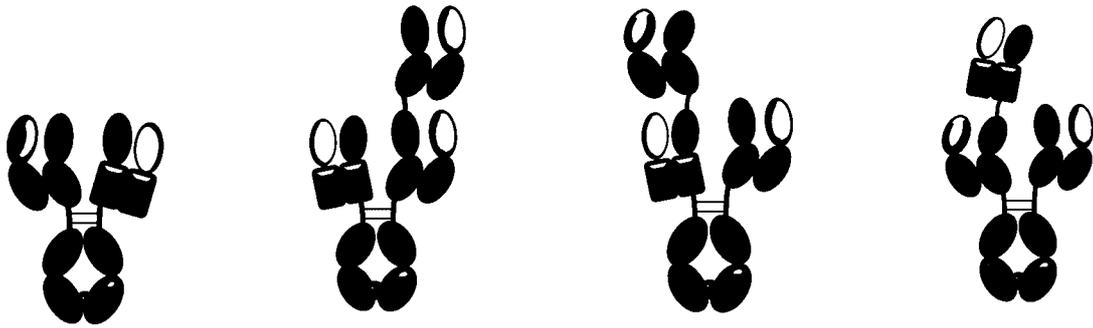
необязательно, второй домен димеризации биспецифического анти-CD3/CD20 полипептидного комплекса функционально связан с переменным доменом тяжелой цепи второй антигенсвязывающей части.

18. Жидкая композиция, лиофилизат или фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-17, где биспецифический анти-CD3/CD20 полипептидный комплекс содержит комбинацию четырех полипептидных последовательностей:

- a) SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36;
- b) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40;
- c) SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44;

d) SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48; или

e) SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52.

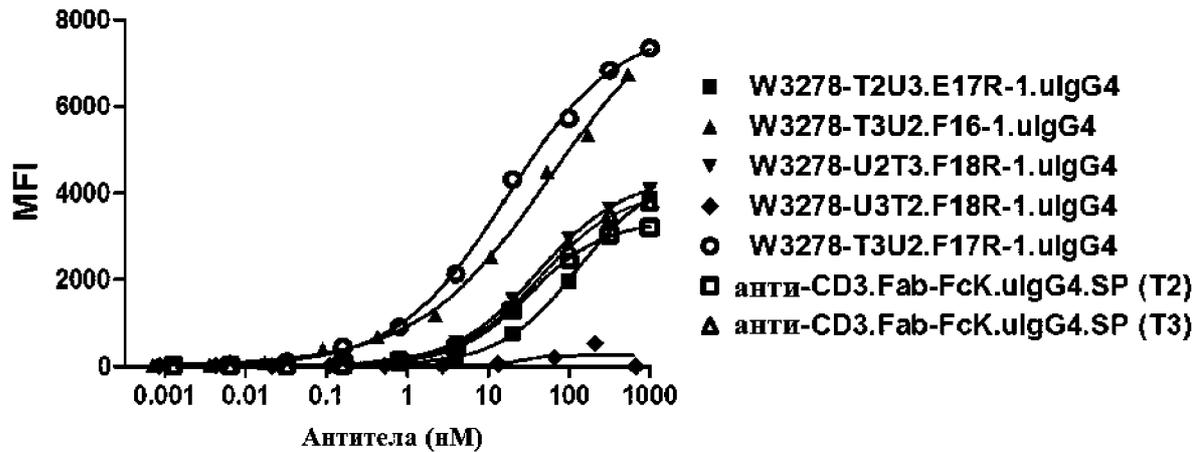
**E17R-1****F16-1****F18R-1****F17R-1**

		
TCR	T2/T3 (анти-CD3)	U2/U3 (анти-CD20)

ФИГУРА 1

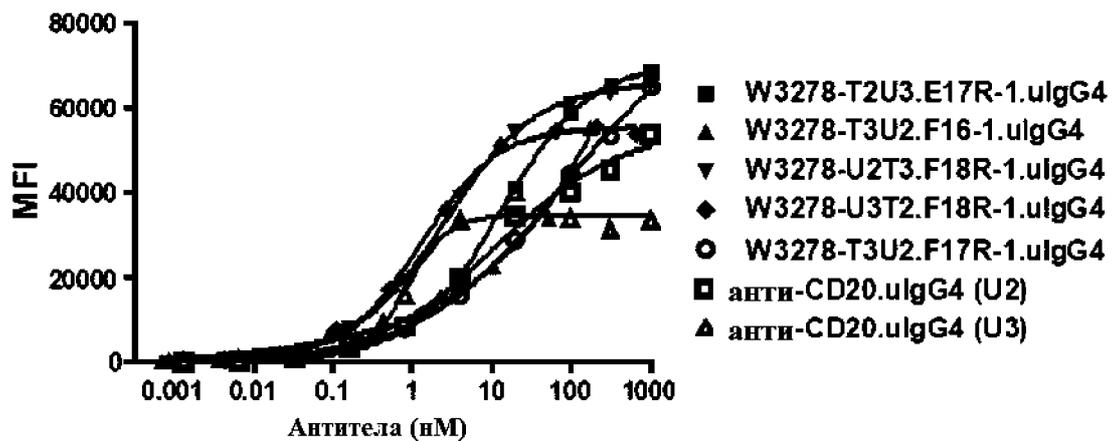
□

Оценка связывания WBP3278 BsAb с Jurkat 2B8



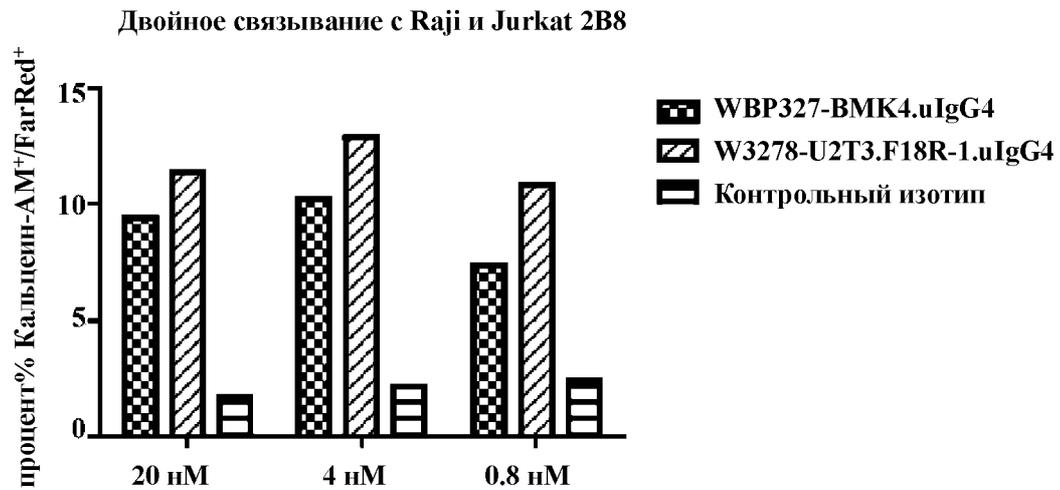
B

Оценка связывания WBP3278 BsAb с Raji

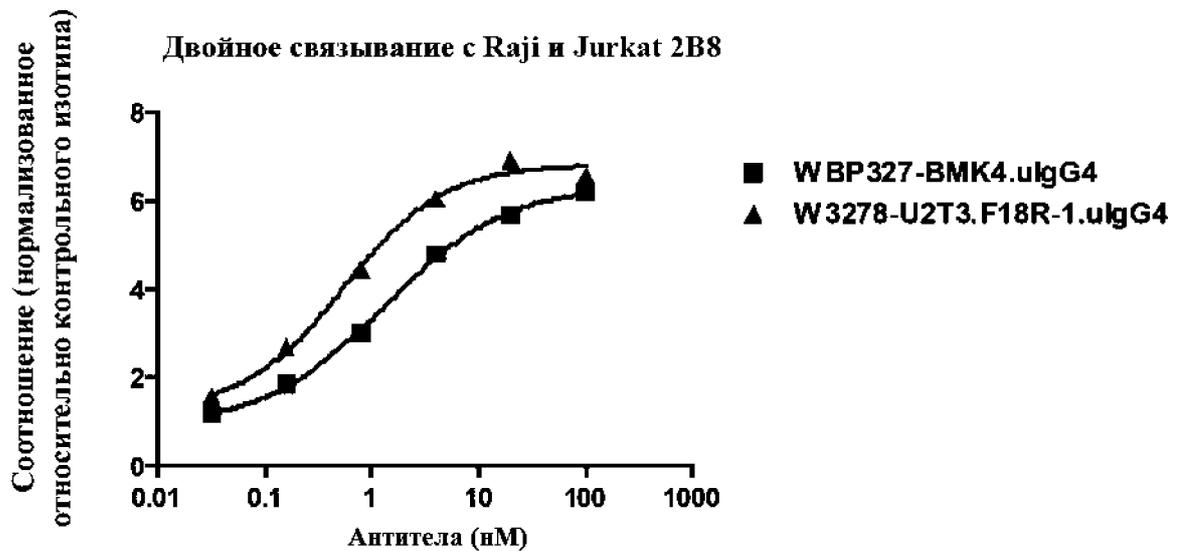


ФИГУРА 2

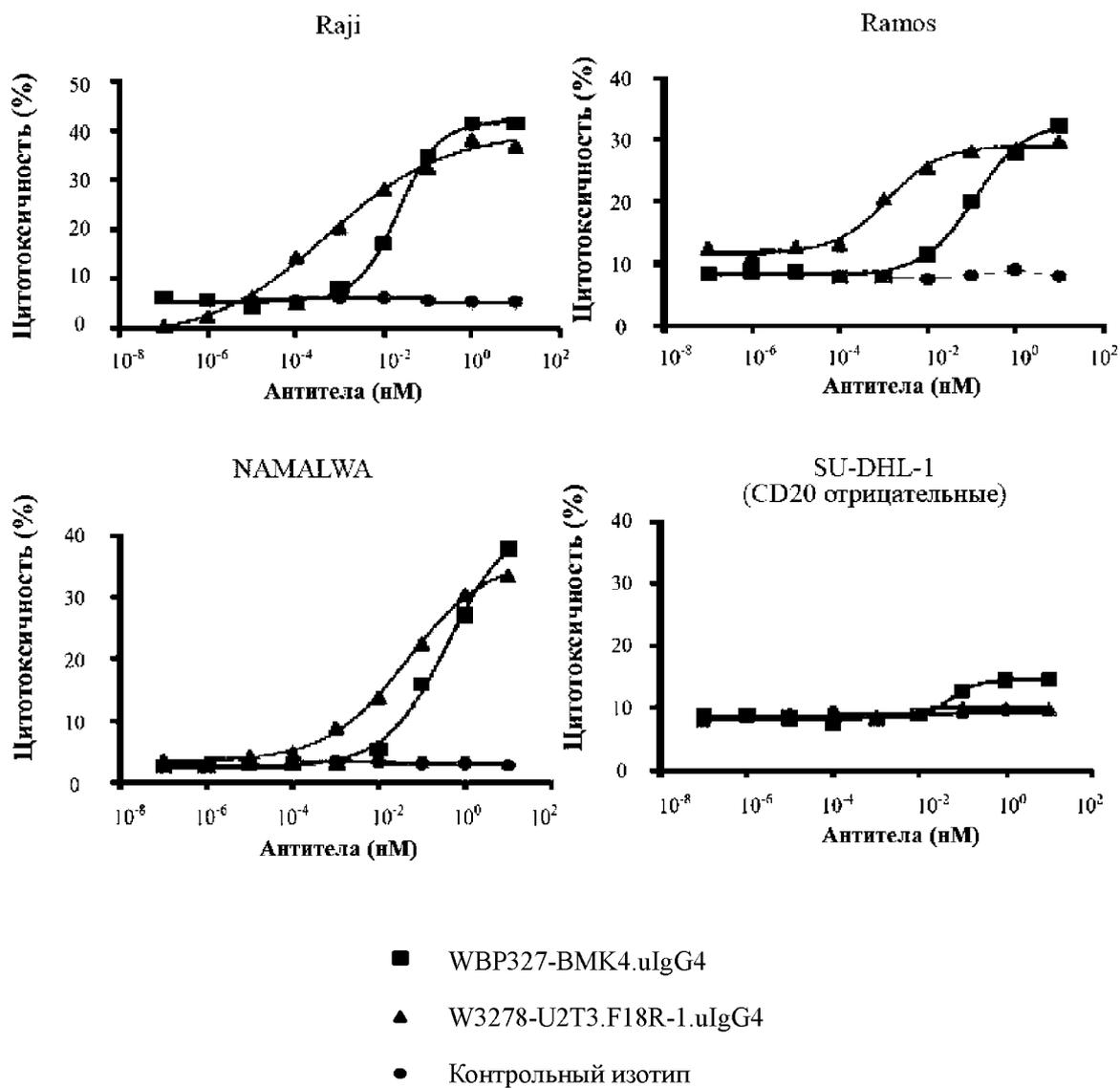
□



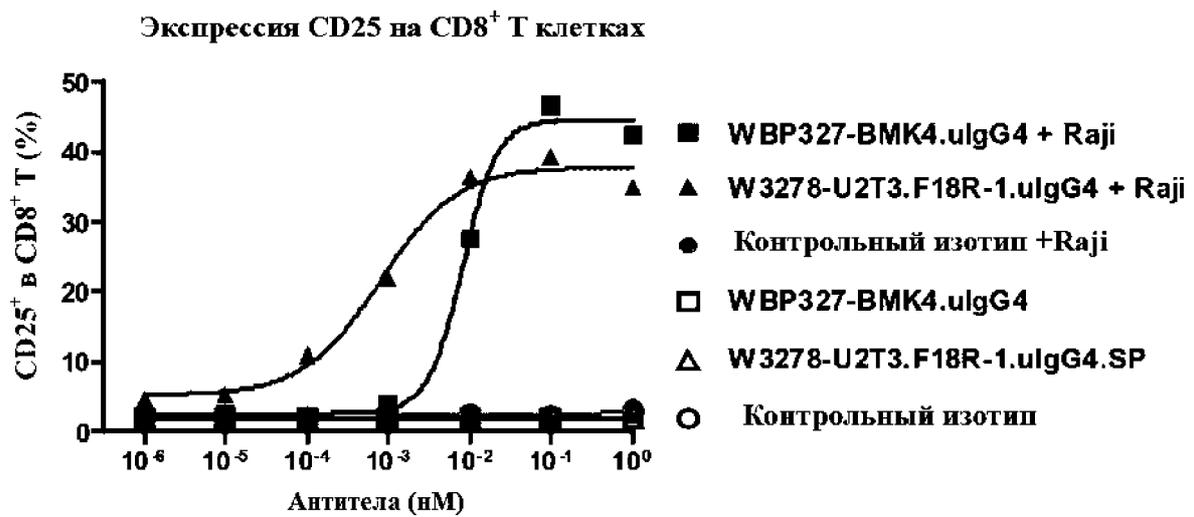
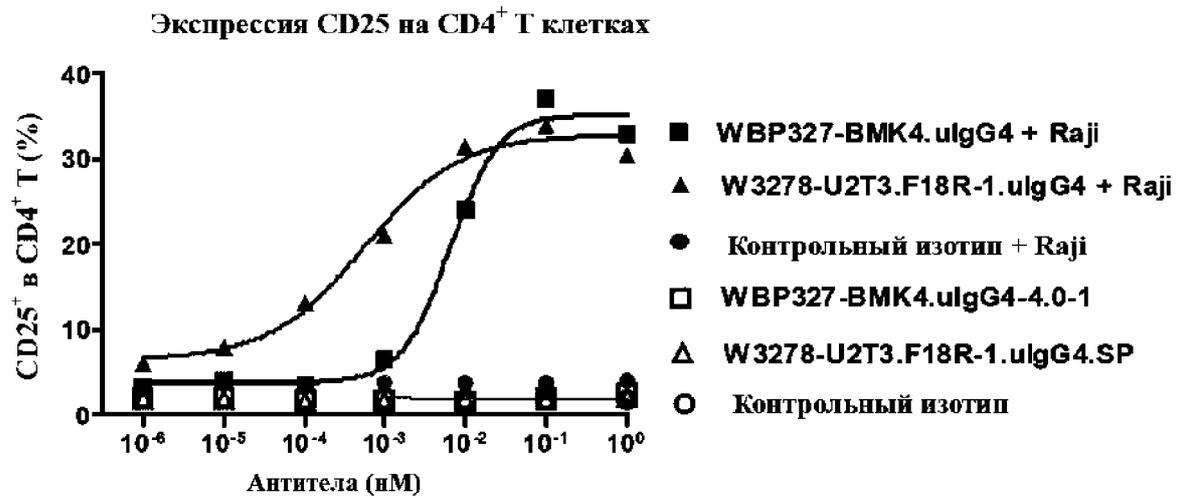
B



ФИГУРА 3

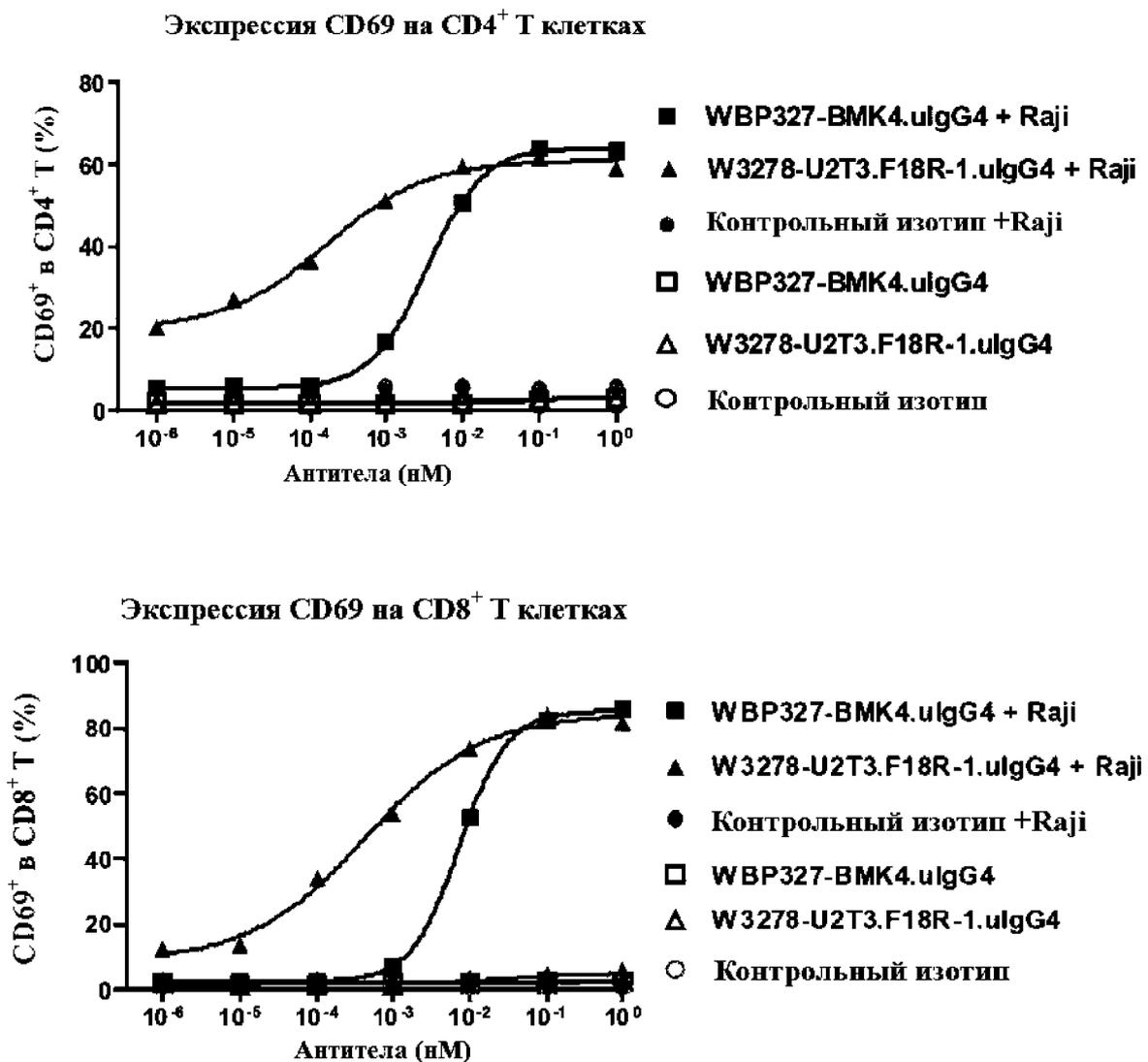


ФИГУРА 4



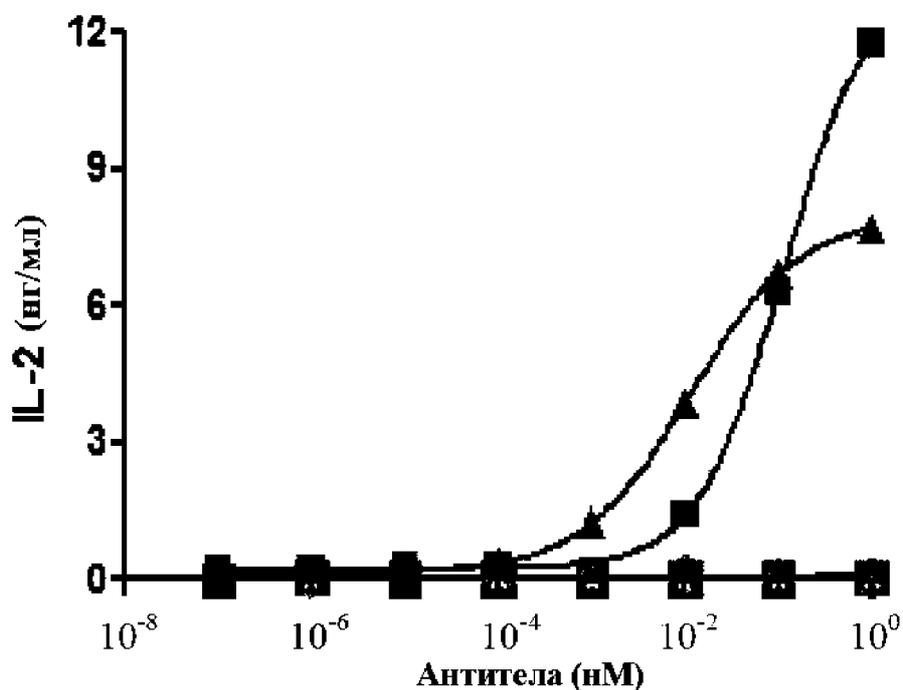
ФИГУРА 5А

B

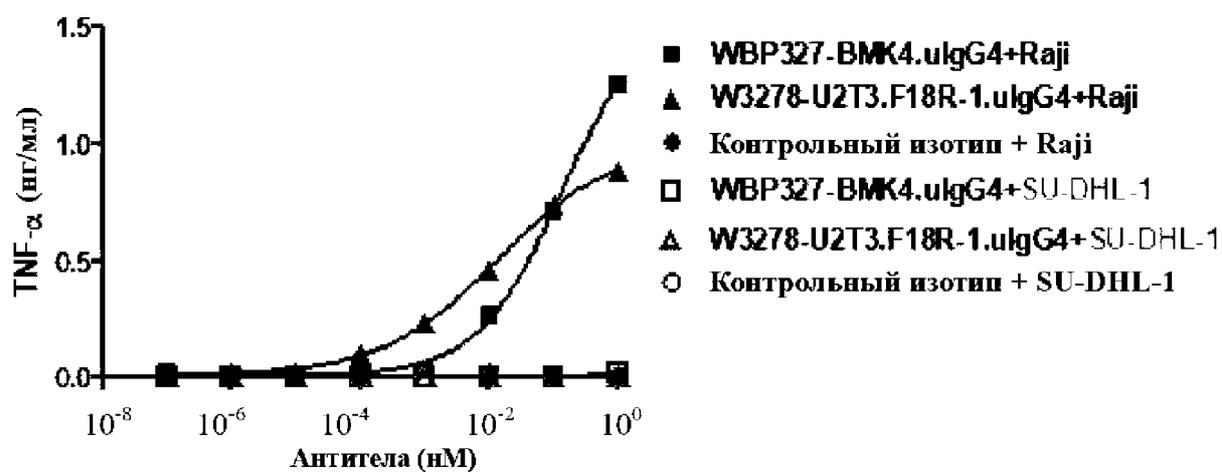


ФИГУРА 5В

□

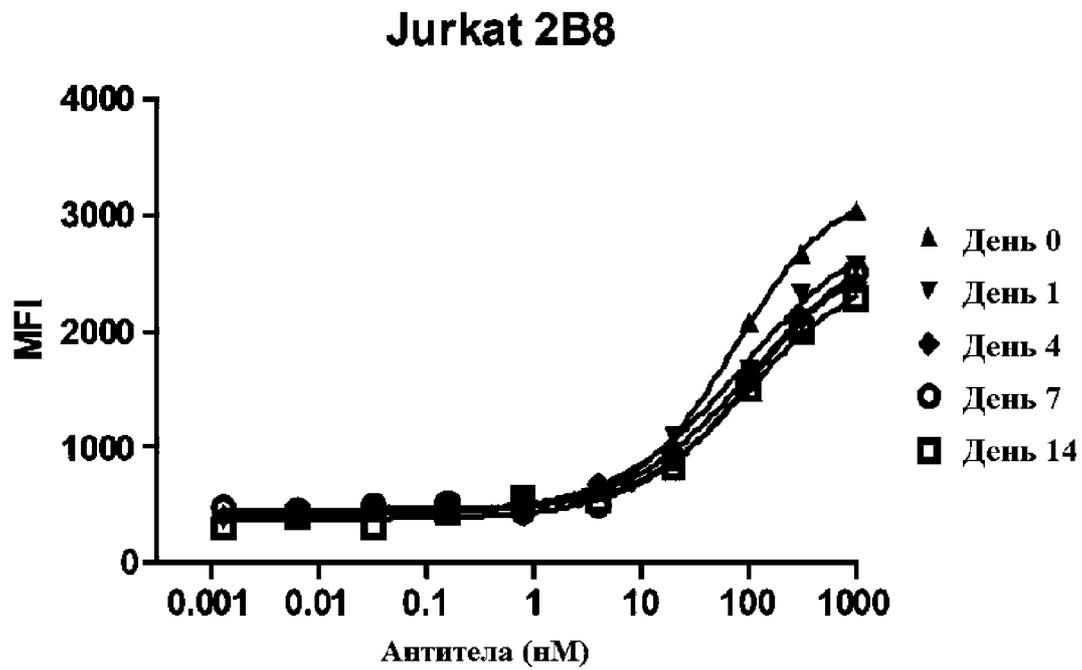
CD4⁺T (IL-2)

B

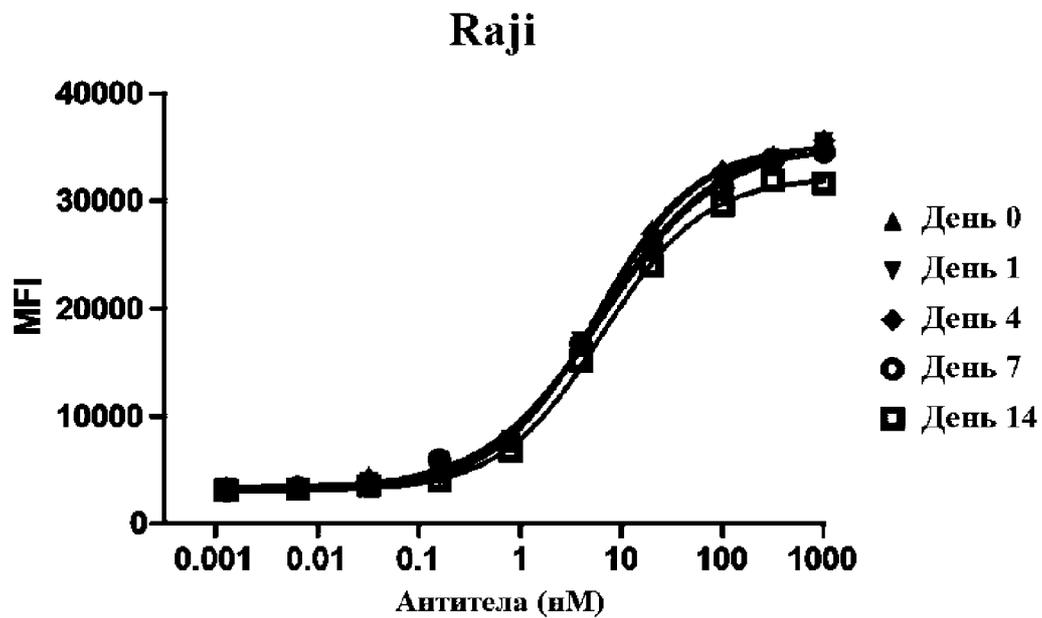
CD4⁺T (TNF- α)

ФИГУРА 6

□

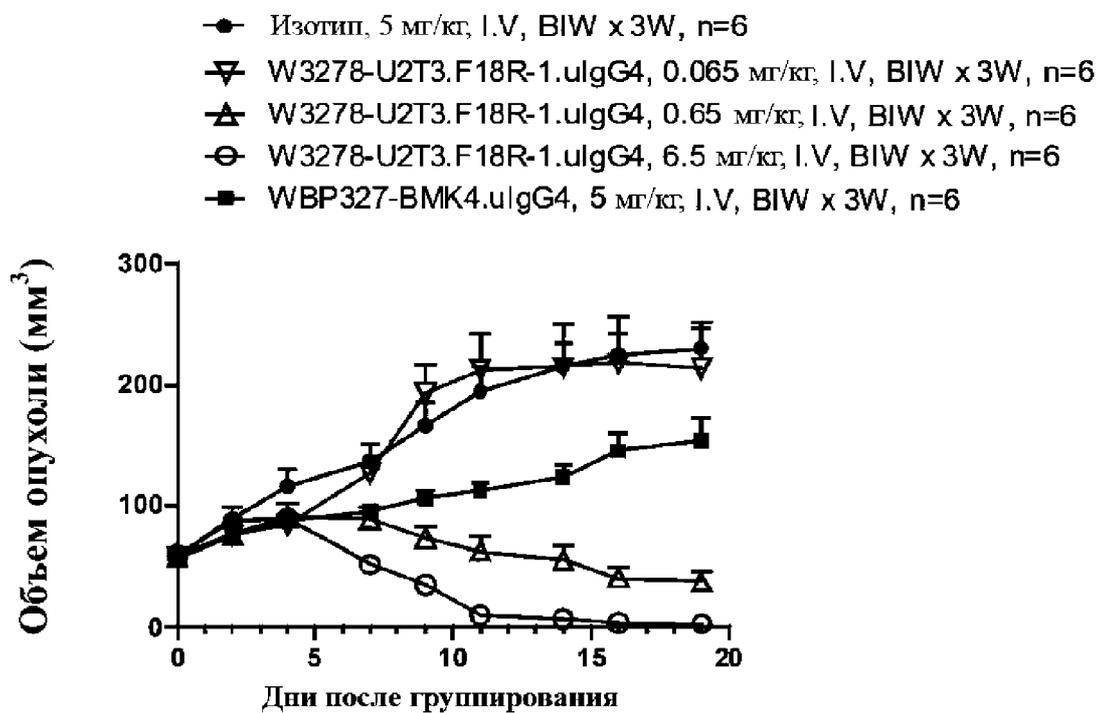


B

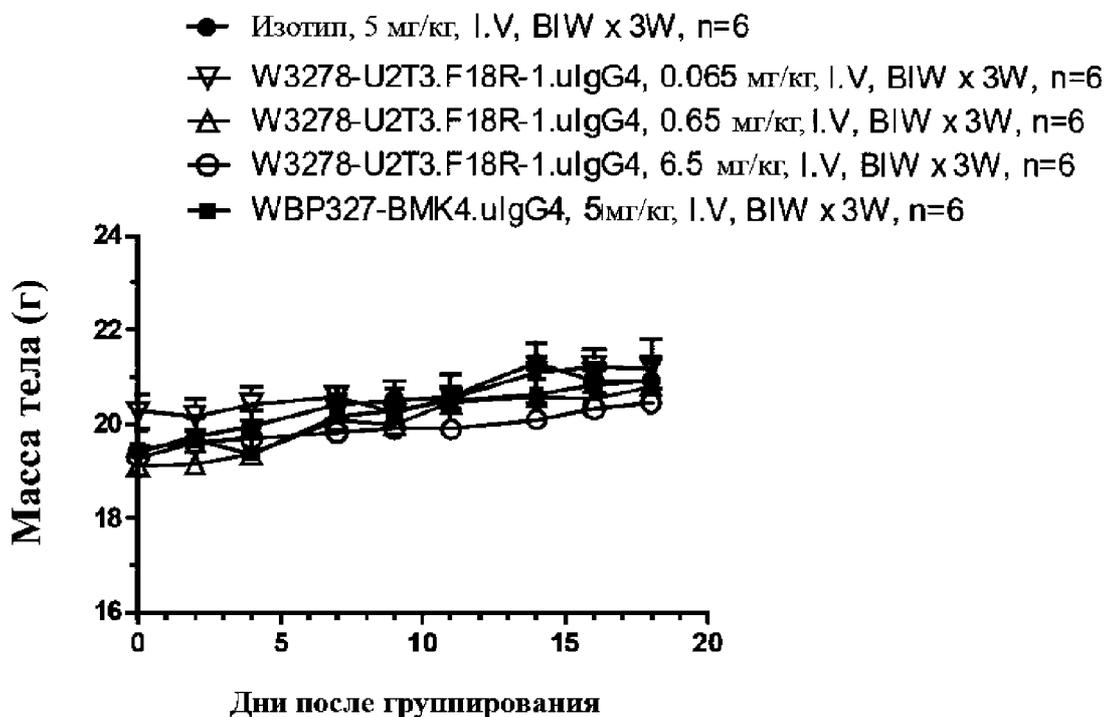


ФИГУРА 7

□

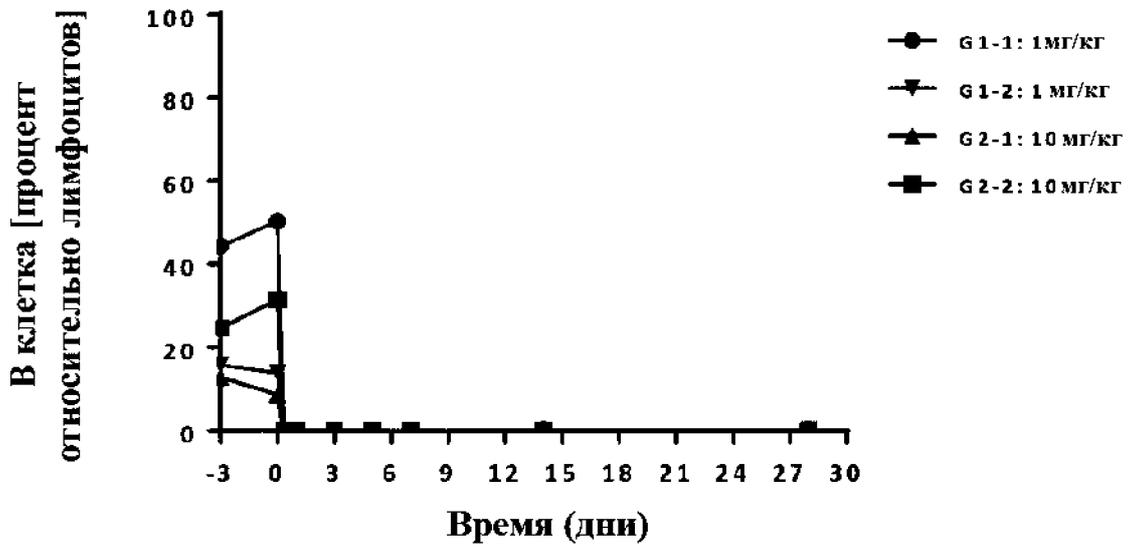


B



ФИГУРА 8

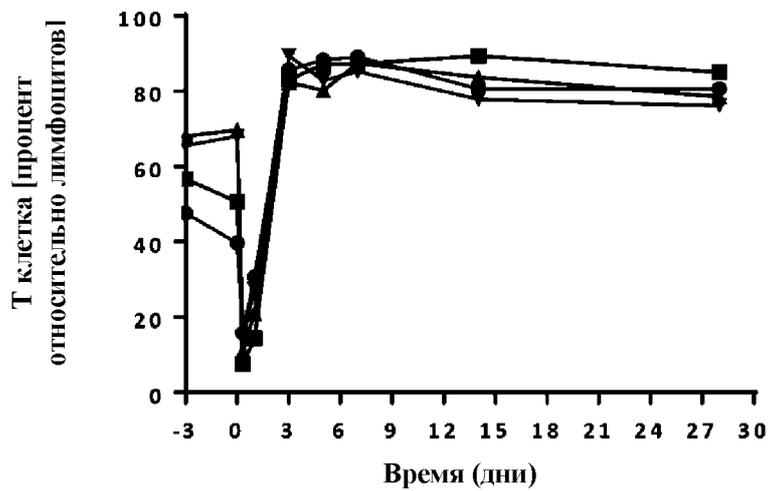
Популяция циркулирующих В клеток



ФИГУРА 9

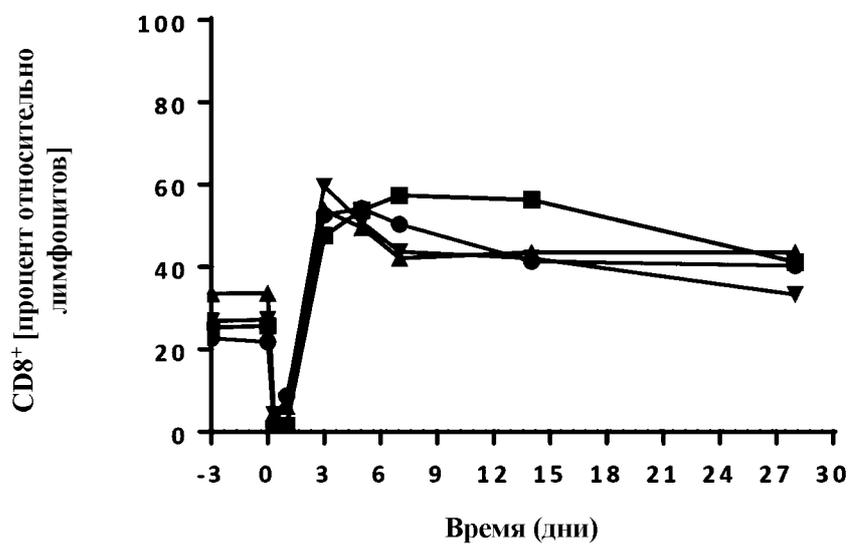
□

Популяция циркулирующих Т клеток



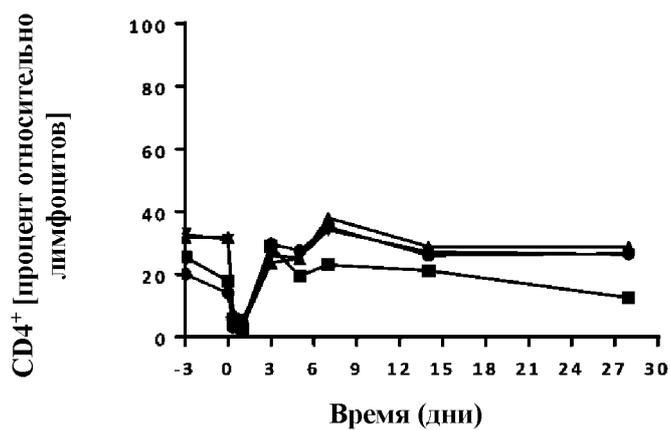
ФИГУРА 10А

В

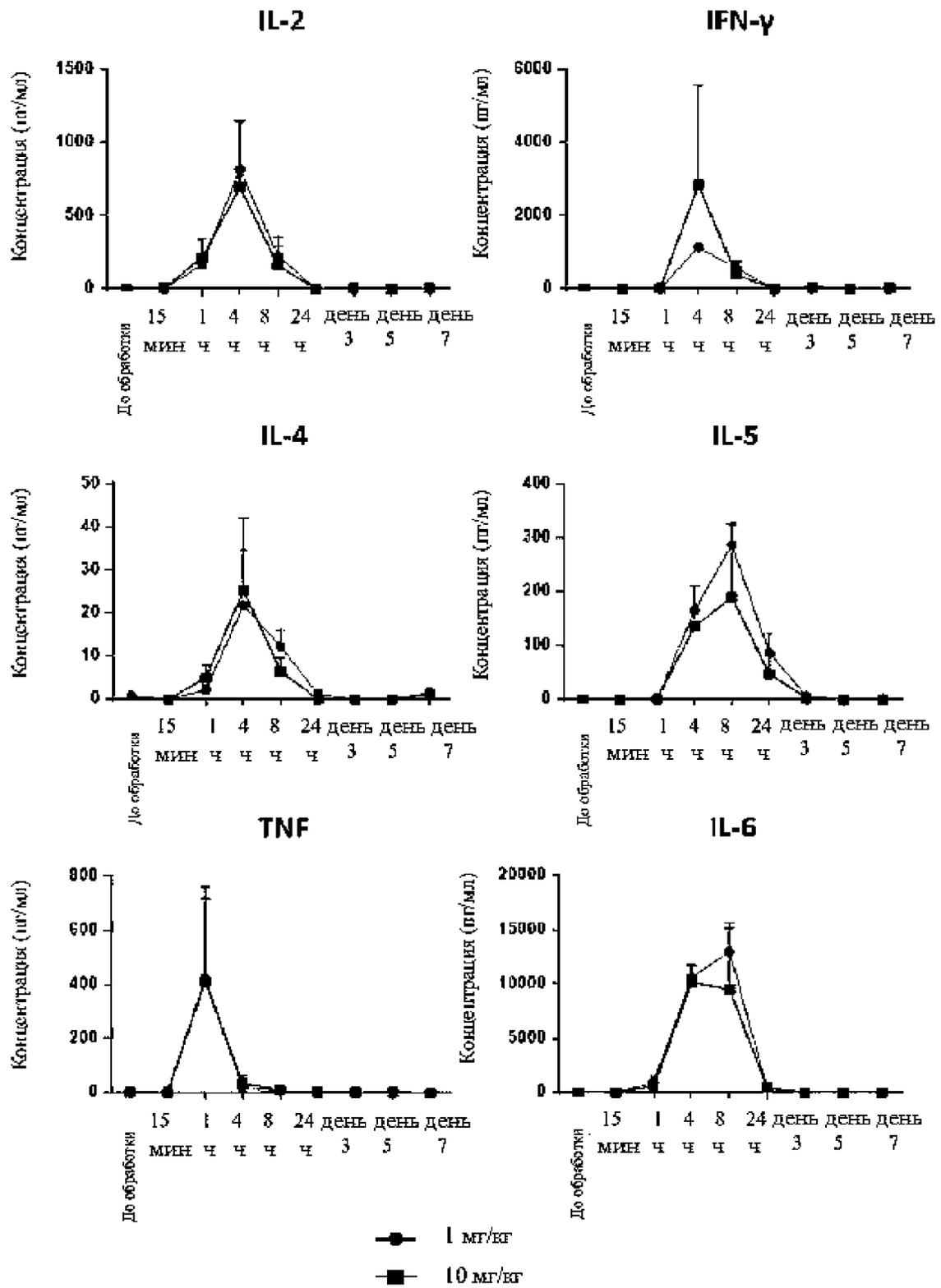
Популяция CD8⁺ Т клеток

ФИГУРА 10В

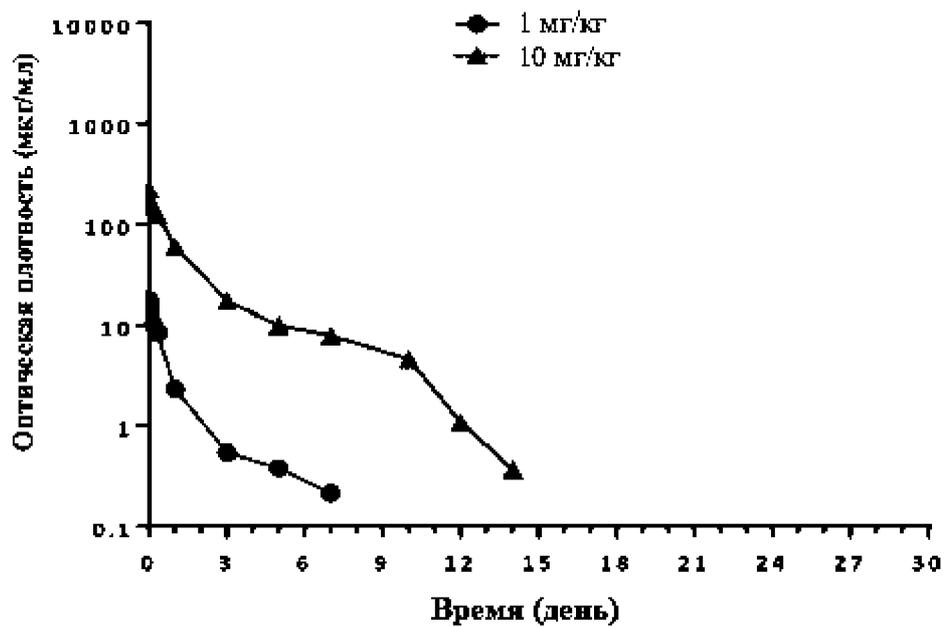
С

Популяция CD4⁺ Т клеток

ФИГУРА 10С



ФИГУРА 11



ФИГУРА 12