

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290597** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.06.09**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2020.08.14**

---

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БИСПЕЦИФИЧНЫЕ  
АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3 И CD20, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **19191964.6**

(32) **2019.08.15**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/072927**

(87) **WO 2021/028587 2021.02.18**

(71) Заявитель:  
**ГЕНМАБ А/С (DK)**

(72) Изобретатель:

**Вальборн Йеспер, Харлоу Лене С,  
Клаусен Якоб Д, Йенсен Метте Х,  
Симандер Кристиан, Пасс Йеспер,  
Мадсен Петер Й, Жэнь Шань,  
Вальбом Мария А С, Бьеррегар  
Боlette (DK)**

(74) Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) В настоящем описании представлены усовершенствованные фармацевтические композиции и единичные дозовые формы биспецифичных антител к CD3xCD20 и способы их введения.

**A1**

**202290597**

**202290597**

**A1**

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ,  
СОДЕРЖАЩИЕ БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3 И CD20,  
И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

**Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение касается фармацевтических композиций и единичных дозовых форм биспецифичных антител, направленных против CD3 и CD20, и их применения.

**Уровень техники**

CD3 известен уже много лет и поэтому он был предметом интереса во многих аспектах. В частности, известны антитела, вырабатываемые против CD3 или T-клеточного рецепторного комплекса, частью которого является CD3.

Перспективным подходом к улучшению адресной терапии антителами является доставка цитотоксических клеток специфически к антигенэкспрессирующим раковым клеткам. Эта концепция применения T-клеток для эффективного уничтожения опухолевых клеток была описана в Staerz et al., 1985, Nature 314:628-631. Однако первые клинические исследования были весьма неудовлетворительными, главным образом из-за низкой эффективности, серьезных побочных эффектов (цитокиновый шторм) и иммуногенности биспецифичных антител (Muller and Kontermann, 2010, BioDrugs 24:89-98). Достижения в разработке и применении биспецифичных антител частично преодолели первоначальный барьер цитокинового шторма и улучшили клиническую эффективность без ограничивающей дозировку токсичности (Garber, 2014, Nat. Rev. Drug Discov. 13:799-801; Lum and Thakur, 2011, BioDrugs 25:365-379). Решающее значение для преодоления изначального барьера цитокинового шторма, как описано для катумаксомаба (Berek et al., 2014, Int. J. Gynecol. Cancer 24(9):1583-1589; Mau-Sørensen et al., 2015, Cancer Chemother. Pharmacol. 75:1065-1073), имело отсутствие или глушение Fc-домена.

Молекула CD20 (также именуется ограниченный В-лимфоцитами дифференцировочным антигеном человека или Vp35) представляет собой гидрофобный трансмембранный белок с молекулярной массой примерно 35 кДа, локализованный на пре-В- и зрелых В-лимфоцитах (Valentine et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287; и Einfield et al., (1988) EMBO J. 7(3):711-717). CD20 встречается на поверхности более чем 90% В-клеток периферической крови или лимфоидных органов и экспрессируется на ранних стадиях развития пре-В-клеток, оставаясь там до дифференцировки плазматических клеток. CD20 присутствует как в нормальных В-клетках, так и в

злокачественных В-клетках. В частности, CD20 экспрессируется в более чем 90% В-клеточных неходжкинских лимфом (NHL) (Anderson et al. (1984) Blood 63(6):1424-1433), но не встречается в гемопоэтических стволовых клетках, про-В-клетках, нормальных плазматических клетках или в других нормальных тканях (Tedder et al. (1985) J. Immunol. 135(2):973-979).

Способы лечения рака, а также аутоиммунных и иммунных заболеваний путем воздействия на CD20 известны в данной области. Например, химерное антитело к CD20 ритуксимаб применялось или предлагалось для применения при лечении рака, например, неходжкинской лимфомы (NHL), хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL) и малой лимфоцитарной лимфомы (SLL). Человеческое моноклональное антитело к CD20 офатумумаб применялось или предлагалось для применения при лечении, среди прочего, различных вариантов CLL, фолликулярной лимфомы (FL), оптиконевромиелита (NMO), диффузного и рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза (RRMS).

Биспецифичные антитела, которые связываются как с CD3, так и с CD20, известны из предшествующего уровня техники.

В WO 2011/028952 описано, среди прочего, получение биспецифичных молекул CD3×CD20 по технологии биспецифичных Fc-доменов XmAb фирмы Xencor.

В WO 2014/047231 описаны REGN1979 и другие биспецифичные антитела CD3×CD20, полученные по технологии FcΔAdp фирмы Regeneron Pharmaceuticals.

Sun et al. (2015, Science Translational Medicine 7, 287ra70) описали нацеленное на В-клетки, зависимое от Т-клеток биспецифичное антитело против CD20/CD3, созданное по технологии “выступы-во-впадины”.

В WO 2016/110576, включенном сюда путем ссылки, предусмотрены биспецифичные антитела против CD3×CD20, а в настоящем изобретении предусмотрены стабильные фармацевтические формы с антителами против CD3×CD20 из WO 2016/110576. Биспецифичные антитела, которые связываются и с CD3, и с CD20, могут быть полезными в таких терапевтических ситуациях, когда требуется специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих CD20, и проводятся исследования таких биспецифичных антител для потенциального лечения NHL, CLL и других В-клеточных злокачественных новообразований. Биспецифичные антитела к CD3×CD20 из предшествующего уровня техники, которые разрабатываются и проходят клинические испытания, обычно вводятся внутривенно (в/в). Такой способ введения может давать высокие значения  $C_{max}$  у биспецифичных антител к CD3×CD20, что может быть связано со слишком высоким уровнем высвобождения цитокинов; сшивание биспецифичными антителами клеток мишени, экспрессирующих CD20, с Т-

клетками ведет к высвобождению цитокинов, например, к высвобождению провоспалительных цитокинов, напр., IL-6, TNF- $\alpha$  или IL-8, что вызывает нежелательные эффекты, например, жара, тошноты, рвоты и озноба. Таким образом, несмотря на уникальную противоопухолевую активность биспецифичных антител, иммунологический механизм их действия вызывает нежелательные “побочные” эффекты, т.е. вызывает нежелательные воспалительные реакции, напр., известные как “цитокиновая реакция первой дозы или синдром первой дозы”. В таких случаях нужно проводить сопутствующее лечение или премедикацию пациентов, напр., с помощью анальгетиков, жаропонижающих и/или нестероидных противовоспалительных средств. Итак, существует неудовлетворенная потребность в модификации или снижении профиля системного высвобождения цитокинов у переориентирующих T-клетки биспецифичных антител при их введении людям или животным. Следовательно, существует потребность в дополнительных препаратах антител и фармацевтических композициях биспецифичных антител, связывающихся с CD3 и CD20, которые можно вводить по-разному с тем, чтобы предотвратить или уменьшить побочные эффекты системного высвобождения цитокинов, но в то же время обеспечить высокоэффективное опосредованное T-клетками уничтожение раковых клеток, экспрессирующих CD20.

Целью настоящего изобретения является получение простых и стабильных фармацевтических композиций биспецифичных антител к CD3 $\times$ CD20, приведенных в WO 2016/110576, в которых биспецифичные антитела к CD3 $\times$ CD20 и сами композиции стабильны в широком диапазоне концентраций антител от 0,5 мг/мл до высоких концентраций антител в 60 мг/мл или 120 мг/мл или даже 150 мг/мл. Другой целью настоящего изобретения является получение фармацевтических композиций биспецифичных антител к CD3 $\times$ CD20, стабильных на протяжении по меньшей мере 3 месяцев и даже больше, например, по меньшей мере 6 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев. Также целью настоящего изобретения является получение препаратов, стабильных в диапазоне температур, например, от 2 $^{\circ}$ C до 25 $^{\circ}$ C. Следующей целью является получение таких фармацевтических композиций биспецифичных антител к CD3 $\times$ CD20, которые подходят для внутривенного и подкожного введения. Во многих случаях пациентам может быть более удобным подкожное введение фармацевтических препаратов, так как продолжительность введения намного короче при подкожном введении, чем при внутривенном введении. Следующей целью настоящего изобретения является получение таких фармацевтических композиций биспецифичных антител к CD3 $\times$ CD20, которые хорошо переносятся по месту подкожной инъекции. Следующей целью является получение таких фармацевтических композиций, которые можно вводить

подкожно, чтобы обеспечить снижение профиля высвобождения цитокинов у пациентов, но в то же время обеспечить высокоэффективное опосредованное Т-клетками уничтожение раковых клеток, экспрессирующих CD20.

### **Сущность изобретения**

Целью настоящего изобретения является получение новых фармацевтических композиций биспецифичных антител, содержащих первую антигенсвязывающую область, происходящую из антитела к CD3, и вторую антигенсвязывающую область, происходящую из антитела к CD20.

Новые композиции, содержащие биспецифичные антитела к CD3×CD20, применимы в таких терапевтических ситуациях, когда требуется специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих CD20. Композиции применимы как для внутривенного введения, так и для подкожного введения.

Соответственно, в главном аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие:

а) 50-120 мг/мл биспецифичного антитела, связывающегося с CD3 человека и с CD20 человека,

б) 20-40 mM ацетата,

с) 140-160 mM сорбитола,

д) поверхностно-активное вещество,

причем значение pH композиции составляет от 5 до 6, а биспецифичное антитело содержит первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение фармацевтических композиций по изобретению для подкожного введения.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение фармацевтических композиций по изобретению для внутривенного введения.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение фармацевтических композиций по изобретению для лечения рака.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака, включающий введение нуждающимся в этом субъектам фармацевтических композиций по изобретению в течение времени, достаточного для лечения рака.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены единичные дозовые формы, включающие:

а) биспецифичное антитело, содержащее первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12,

в количестве от 5 мкг до 50 мг,

б) ацетатный буфер и сорбитол в соотношении от 1:5 до 1:10, при этом осмоляльность единичной дозовой формы составляет от 210 до 250 мМ, а pH – от 5 до 6, например, 5,5, и с) поверхностно-активное вещество.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены единичные дозовые формы, включающие:

а) биспецифичное антитело, содержащее первую область связывания,

связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12,

в количестве от 5 мкг до 50 мг,

b) ацетатный буфер в концентрации 30 мМ при pH 5,5,

c) сорбитол в концентрации 150 мМ и

d) 0,04% масс. полисорбата 80.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие или содержащие:

a) эпкоритамаб или его биоаналог в количестве от 0,5 мг до 120 мг/мл,

b) ацетатный буфер в концентрации 30 мМ при pH 5,5,

c) сорбитол в концентрации 150 мМ и

d) 0,04% масс. полисорбата 80.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены единичные дозовые формы, включающие или содержащие:

a) эпкоритамаб или его биоаналог в количестве от 0,5 мкг до 120 мг,

b) ацетатный буфер в концентрации 30 мМ при pH 5,5,

c) сорбитол в концентрации 250 мМ и

d) 0,04% масс. полисорбата 80.

Эти и другие аспекты и воплощения описаны более подробно в следующих разделах.

### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1. Скрининг по растворимости дуотело CD3xCD20 в различных составах.

Дуотело CD3xCD20 помещали в указанные буферы, а затем концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с заданными интервалами центрифугирования. Концентрации каждой композиции измеряли после центрифугирования в течение 20, 50, 60 или 90 мин.

Фиг. 2. Вязкость дуотела CD3xCD20 (120-150 мг/мл) в различных составах. Вязкость (сП) концентрированных образцов дуотела CD3xCD20 (120-150 мг/мл) измеряли при различных скоростях сдвига в указанных составах с помощью конического/пластинчатого реометра Wells-Brookfield.

Фиг. 3. Средние уровни в крови цитокинов на группу яванских макак, получавших однократную внутривенную дозу (0,1 или 1 мг/кг) или однократную подкожную дозу (0,1 или 1 мг/кг) дуотела CD3xCD20.

Фиг. 4. Влияние 4-кратного внутривенного введения дуотела CD3xCD20 на В-клетки в периферической крови яванских макак. (А) Среднее число В-клеток (клеток CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови яванских макак после 4 еженедельных внутривенных доз (0,01, 0,1 или 1 мг/кг) дуотела CD3xCD20 на 1 дозовую группу. (В) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в виде абсолютного числа клеток (клетки/мкл).

Фиг. 5. Влияние однократной подкожной дозы дуотела CD3xCD20 на В-клетки в периферической крови яванских макак. (А) Среднее число В-клеток по времени в периферической крови яванских макак после однократной подкожной дозы (0,01, 0,1, 1, 10 или 20 мг/кг) дуотела CD3xCD20 на 1 дозовую группу. (В) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в виде абсолютного числа клеток (клеток/мкл).

Фиг. 6. Влияние внутривенного введения начальной дозы с последующим введением целевой дозы дуотела CD3xCD20 на В-клетки в периферической крови яванских макак. Среднее число В-клеток (клеток CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови яванских макак, получавших внутривенную инфузию в качестве начальной дозы (0,01 мг/кг) с последующим введением на следующий день одной целевой дозы (1 мг/кг; в/в). Количества В-клеток представлены в виде абсолютного числа клеток (клеток/мкл).

Фиг. 7. Влияние 4-кратного внутривенного введения дуотела CD3xCD20 на В-клетки в лимфатических узлах яванских макак. (А) Средняя частота В-клеток (клеток CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) в процентах от общей популяции лимфоцитов по времени в лимфатических узлах яванских макак после 4 еженедельных внутривенных доз (0,01, 0,1

или 1 мг/кг) дуотела CD3xCD20 на 1 дозовую группу. (B) Средняя частота В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от частоты В-клеток до введения дозы.

Фиг. 8. Влияние однократной подкожной дозы дуотела CD3xCD20 на В-клетки в лимфатических узлах яванских макак. (A) Средняя частота В-клеток (клеток CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) в процентах от общей популяции лимфоцитов по времени в лимфатических узлах яванских макак после однократной подкожной дозы (0,01, 0,1, 1, 10 или 20 мг/кг) дуотела CD3xCD20 на 1 дозовую группу. (B) Средняя частота В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от частоты В-клеток до введения дозы.

Фиг. 9. Влияние внутривенного введения начальной дозы с последующим введением целевой дозы дуотела CD3xCD20 на В-клетки в лимфатических узлах яванских макак. Средняя частота В-клеток (клеток CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) в процентах от общей популяции лимфоцитов по времени в лимфатических узлах яванских макак, получавших внутривенную инфузию в качестве начальной дозы (0,01 мг/кг) с последующим введением через 1 день одной целевой дозы (1 мг/кг; в/в).

Фиг. 10. Истощение и восстановление В-клеток в селезенке и лимфатических узлах яванских макак после внутривенного введения дуотела CD3xCD20. Верхние панели: яванской макаке 1 вводили 0,01 мг/кг дуотело CD3xCD20 в качестве начальной дозы в 1-й день и целевой дозы 1 мг/кг во 2-й день. Животное забивали на 29-й день по графику. Количество В-клеток в периферической крови на момент вскрытия не восстановилось. Нижние панели: яванской макаке 2 вводили 4 еженедельные дозы дуотела Cd3xCD20 по 1 мг/кг. Животное забивали на 148-й день после восстановления В-клеток в периферической крови. Замороженные срезы лимфатических узлов и селезенки окрашивали с помощью специфичных к CD19 антител для выявления В-клеток (коричневая окраска). Для выявления ядер в клетках использовали гематоксилин (синяя окраска).

Фиг. 11. Влияние 5-кратного внутривенного введения дуотела CD3xCD20 на В-клетки в периферической крови самцов яванских макак. (A) Среднее число В-клеток (клеток CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови самцов яванских макак после 5 еженедельных внутривенных доз физраствора либо 0,01, 0,1 или 1 мг/кг дуотело CD3xCD20 на 1 дозовую группу. (B) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в % от всех выявленных лимфоцитов.

Фиг. 12. Влияние 5-кратного внутривенного введения дуотела CD3xCD20 на В-клетки в периферической крови самок яванских макак. (A) Среднее число В-клеток (клеток CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови самок яванских макак после 5 еженедельных внутривенных доз физраствора либо 0,01, 0,1 или 1

мг/кг дуотело CD3хCD20 на 1 дозовую группу. (B) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в % от всех выявленных лимфоцитов.

Фиг. 13. Влияние однократного внутривенного введения дуотела CD3хCD20 на В-клетки в периферической крови самцов яванских макак. (A) Среднее число В-клеток (клеток CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови самцов яванских макак после однократного внутривенного вливания 0,1 или 1 мг/кг дуотело CD3хCD20 на 1 дозовую группу. (B) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в % от всех выявленных лимфоцитов.

Фиг. 14. Влияние однократного внутривенного введения дуотела CD3хCD20 на В-клетки в периферической крови самок яванских макак. (A) Среднее число В-клеток (клеток CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови самок яванских макак после однократного внутривенного вливания 0,1 или 1 мг/кг дуотело CD3хCD20 на 1 дозовую группу. (B) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в % от всех выявленных лимфоцитов.

Фиг. 15. Влияние подкожного введения дуотела CD3хCD20 на В-клетки в периферической крови самцов яванских макак. (A) Среднее число В-клеток (клеток CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови самцов яванских макак после подкожного введения 0,1, 1 или 10 мг/кг дуотело CD3хCD20 на 1 дозовую группу. (B) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в % от всех выявленных лимфоцитов.

Фиг. 16. Влияние подкожного введения дуотела CD3хCD20 на В-клетки в периферической крови самок яванских макак. (A) Среднее число В-клеток (клеток CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) по времени в периферической крови самок яванских макак после подкожного введения 0,1, 1 или 10 мг/кг дуотело CD3хCD20 на 1 дозовую группу. (B) Среднее число В-клеток на 1 дозовую группу в процентах от числа В-клеток до введения дозы. Количества В-клеток представлены в % от всех выявленных лимфоцитов.

Фиг. 17. (A) Индивидуальные профили концентрации в плазме яванских макак после внутривенного введения дуотела CD3хCD20. (B) Индивидуальные профили концентрации в плазме яванских макак после подкожного введения дуотела CD3хCD20. Профили концентрации дуотела CD3хCD20 в плазме измеряли после подкожного введения однократной дозы дуотела CD3хCD20 при уровне дозы в 0,01, 0,1, 1, 10 или 20

мг/кг. (С) Групповые средние профили концентрации в плазме яванских макак после внутривенного или подкожного введения.

Фиг. 18. Аппроксимация данных по НМWP и чистоте (основной пик) для образцов, хранившихся при 40°C в течение 8 недель, когда значительное влияние на результаты оказывают такие факторы, как уровни NaCl и pH. На фиг. 18А представлен график зависимости НМW по SEC (%) от pH и концентрации NaCl, из которого видно, что оптимальные результаты (низкий % НМW) достигаются при низком уровне NaCl (напр., 0) и высоком pH (напр., 5,3-5,5). Точно так же на фиг. 18В представлен график зависимости чистоты по SEC (%), из которого видно, что оптимальные результаты (высокая чистота в % по SEC) достигаются при низком уровне NaCl (напр., 0) и высоком pH (напр., 5,3-5,5).

### **Раскрытие сущности изобретения**

#### **Определения**

Термин “иммуноглобулин” обозначает класс структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей: одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре соединяются между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена. Например, см. *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul W., ed., 2nd ed., Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно VH или V<sub>H</sub>) и константной области тяжелой цепи (сокращенно CH или C<sub>H</sub>). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Шарнирная область находится между доменами CH1 и CH2 тяжелой цепи и она очень гибкая. Дисульфидные связи в шарнирной области являются частью взаимодействия между двумя тяжелыми цепями в молекуле IgG. Каждая легкая цепь обычно состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно VL или V<sub>L</sub>) и константной области легкой цепи (сокращенно CL или C<sub>L</sub>). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена CL. Области VH и VL можно еще подразделить на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или по форме структурно определенных петель), которые также именуются определяющими комплементарность участками (CDR) и перемежаются с более консервативными участками, именуемыми каркасными участками (FR). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных с N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)). Если не указано иначе или не противоречит контексту, последовательности CDR идентифицируются здесь

в соответствии с правилами IMGT (Brochet X., *Nucleic Acids Res.* 2008, 36: W503-508 и Lefranc MP., *Nucleic Acids Research* 1999, 27:209-212; также см. [http-адрес в Интернете: http://www.imgt.org/](http://www.imgt.org/)). Если не указано иначе или не противоречит контексту, ссылки на положения аминокислот в константных областях в настоящем изобретении приводятся по нумерации EU (Edelman et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, 1991, NIH Publication No. 91-3242). Например, здесь в SEQ ID NO: 15 представлены аминокислоты в положениях 118-447 по нумерации EU в константной области тяжелой цепи IgG1.

Термин “аминокислота, соответствующая положению...” в настоящем изобретении означает номер положения аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти при сопоставлении с IgG1 человека. Так, аминокислоты или отрезок в одной последовательности, который “соответствует” аминокислотам или отрезку в другой последовательности, совмещается с другими аминокислотами или отрезком с помощью единичной программы совмещения последовательностей, например, ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно при настройках по умолчанию, и по меньшей мере на 50%, на 80%, на 90% или на 95% идентичны тяжелой цепи IgG1 человека. В данной области считается хорошо известным, как проводится совмещение последовательности или отрезка в последовательности и тем самым определяются положения в последовательности, соответствующие положениям аминокислот по настоящему изобретению.

Термин “антитело” (Ab) в контексте настоящего изобретения означает молекулы иммуноглобулина, фрагменты молекул иммуноглобулина или производные тех и других, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях с периодом полураспада, составляющим значительный промежуток времени, например, по меньшей мере 30 минут либо 45 минут либо 1 часа либо 2 часов либо 4 часов либо 8 часов либо 12 часов или 24 часов и более, 48 часов и более, 3, 4, 5, 6, 7 и более дней и т.д. или же любой другой соответствующий функционально определенный период (например, время, достаточное для индуцирования, стимулирования, усиления и/или модулирования физиологической реакции, связанной со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для задействования антителом эффекторной активности). Вариабельные области тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Термин “антигенсвязывающая область” в настоящем изобретении означает область, которая взаимодействует с антигеном и включает области VH и VL. Термин “антитело” в настоящем изобретении включает не только моносpezifичные антитела, но

также и мультиспецифичные антитела, которые содержат несколько, например, два или больше, напр., три или больше различных антигенсвязывающих областей. Константные области антител (Abs) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (типа эффекторных клеток) и компоненты системы комплемента, например, C1q, первого компонента в классическом пути активации комплемента. Как указано выше, термин “антитело”, если не указано иначе или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антител, которые являются антигенсвязывающими фрагментами, т.е. сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Показано, что антигенсвязывающая функция антител может выполняться фрагментами полноразмерных антител. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином “антитело”, включают: (i) Fab'- или Fab-фрагмент – моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, как описано в WO 2007/059782 (Genmab); (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты – бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий в основном из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий в основном из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит в основном из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov, 21(11):484-90); (vi) верблюжки или нанотела (Revets et al., Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan, 5(1):111-24); и (vii) выделенные определяющие комплементарность участки (CDR). Более того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, рекомбинантными методами их можно соединить синтетическим линкером, что позволяет их получать в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH соединяются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), к примеру, см. Bird et al., Science 242, 423-426 (1988); и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином “антитело”, если не указано иначе или четко не диктуется контекстом. Хотя такие фрагменты обычно включаются в определение антител, они в совокупности и каждый по отдельности являются уникальными признаками настоящего изобретения, проявляя различные биологические свойства и их применения. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения, а также биспецифичные форматы таких фрагментов рассматриваются далее ниже. К тому же следует иметь в виду, что термин антитело, если не указано иначе, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAbs), антителоподобные полипептиды, химерные антитела и гуманизованные антитела,

а также фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные любым известным методом, например, ферментативного расщепления, пептидного синтеза и рекомбинантных методов. Полученные антитела могут иметь любой изотип. При этом термин “изотип” означает класс иммуноглобулинов (напр., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. При указании конкретного изотипа, напр., IgG1, этот термин не ограничивается конкретной последовательностью изотипа, напр., определенной последовательностью IgG1, но применяется для указания того, что антитело ближе по последовательности к этому изотипу, напр., IgG1, чем к другим изотипам. Так, напр., антитело IgG1 по изобретению может быть вариантом последовательности природного антитела IgG1, включающим вариации в константных областях.

Термин “моноклональное антитело” в настоящем изобретении означает препарат молекул антитела единого молекулярного состава. Препарат моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и сродство к определенному эпитопу. Соответственно, термин “человеческое моноклональное антитело” относится к антителам, проявляющим единую специфичность связывания, у которых переменные и константные области происходят из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие моноклональные антитела могут вырабатываться гибридомой, включающей слитые с иммортализованными клетками В-клетки, полученные из трансгенного или трансхромосомного животного, например, трансгенной мыши, в геноме которых содержится трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека.

Термин “биспецифичное антитело” или “bs” или “bsAb” в контексте настоящего изобретения относится к антителам, имеющим две разные антигенсвязывающие области, определяемые различными последовательностями антител. Биспецифичные антитела могут быть в любом формате.

В настоящем изобретении термины “половина молекулы”, “Fab-плечо” и “плечо” обозначают одну пару тяжелая цепь-легкая цепь.

При описании биспецифичных антител, включающих одну половину молекулы антитела, “производную” от первого антитела, и одну половину молекулы антитела, “производную” от второго антитела, термин “происходит от” означает то, что биспецифичное антитело получено путем рекомбинации, любым известным способом, данных половинок молекул каждого из указанных первого и второго антитела с образованием биспецифичного антитела. При этом “рекомбинация” не должна ограничиваться каким-то конкретным методом рекомбинации, поэтому она включает все

способы получения биспецифичных антител, описанные ниже, включая, к примеру, рекомбинацию путем обмена половинок молекул (что также известно как “контролируемый обмен Fab-плечами”), а также рекомбинацию на уровне нуклеиновых кислот и/или посредством совместной экспрессии двух половинок молекул в одних и тех же клетках.

Термин “моновалентное антитело” в контексте настоящего изобретения означает то, что молекула антитела способна связывать одну молекулу антигена и поэтому не способна сшивать антигены или клетки.

Термин “полноразмерное” в применении к антителам означает то, что антитело не является фрагментом, а содержит все домены определенного изотипа, которые обычно встречаются у этого изотипа в природе, напр., домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнирный, VL и CL у антител IgG1.

В настоящем описании, если это не противоречит контексту, термин “Fc-область” означает область антитела, состоящую из последовательностей Fc двух тяжелых цепей иммуноглобулина, причем данные последовательности Fc содержат как минимум шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

В настоящем описании термин “гетеродимерное взаимодействие между первым и вторым участками CH3” относится к взаимодействию между первым участком CH3 и вторым участком CH3 в гетеродимерном белке, например, первый-CH3/второй-CH3.

В настоящем описании термин “гомодимерное взаимодействие между первым и вторым участками CH3” относится к взаимодействию между первым участком CH3 и другим первым участком CH3 в гомодимерном белке, например, первый-CH3/первый-CH3 и к взаимодействию между вторым участком CH3 и другим вторым участком CH3 в гомодимерном белке, например, второй-CH3/второй-CH3.

В настоящем описании термин “связывание” в контексте связывания антитела с заданным антигеном обычно означает связывание со сродством, соответствующим значению  $K_D$  в  $10^6$  М или меньше, напр.,  $10^7$  М или меньше, например,  $10^8$  М или меньше, например,  $10^9$  М или меньше,  $10^{10}$  М или меньше или  $10^{11}$  М и даже меньше при определении, к примеру, по технологии BioLayer Interferometry (BLI) на приборе Octet HTX, используя антитело в качестве лиганда и антиген в качестве анализируемого вещества, причем антитело связывается с заданным антигеном со сродством, соответствующим значению  $K_D$ , которое по меньшей мере в 10 раз ниже, например, в 100 раз ниже, к примеру, в 1000 раз ниже, например, в 10 000 раз ниже, например, в 100 000 раз ниже значения  $K_D$  для своего связывания с неспецифическим антигеном (напр., BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Степень

снижения  $K_D$  при связывании зависит от значения  $K_D$  антитела с тем, что при очень низком  $K_D$  антитела степень снижения  $K_D$  при связывании с антигеном относительно  $K_D$  при связывании с неспецифическим антигеном может составлять по меньшей мере 10 000 раз (то есть антитело очень специфично). Термин “ $K_D$ ” (M) в настоящем изобретении означает равновесную константу диссоциации при определенном взаимодействии антитело-антиген. При этом сродство обратно пропорционально  $K_D$ , то есть повышение сродства означает снижение  $K_D$ , а снижение сродства означает повышение  $K_D$ .

В предпочтительном воплощении антитела по изобретению являются выделенными. “Выделенное антитело” в настоящем изобретении означает такое антитело, которое практически не содержит других антител с другой антигенной специфичностью. В предпочтительном воплощении выделенное биспецифичное антитело, которое специфически связывается с CD20 и CD3, к тому же практически не содержит моноспецифичных антител, специфически связывающихся с CD20 или CD3.

Термин “CD3” в настоящем изобретении означает белок кластера дифференцировки 3 человека, который входит в состав белкового комплекса с Т-клеточным рецептором и состоит из четырех отдельных цепей. CD3 встречается и у других видов, поэтому термин “CD3” не ограничивается CD3 человека, если это не противоречит контексту. У млекопитающих этот комплекс содержит цепь CD3 $\gamma$  (гамма) (CD3 $\gamma$  человека: UniProtKB/Swiss-Prot No. P09693, CD3 $\gamma$  яванского макака: UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI7), цепь CD3 $\delta$  (дельта) (CD3 $\delta$  человека: UniProtKB/Swiss-Prot No. P04234, CD3 $\delta$  яванского макака: UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI8), две цепи CD3 $\epsilon$  (эпсилон) (CD3 $\epsilon$  человека: UniProtKB/Swiss-Prot No. P07766, CD3 $\epsilon$  яванского макака: UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI5, CD3 $\epsilon$  макаки-резус: UniProtKB/Swiss-Prot No. G7NCB9), и цепь CD3 $\zeta$  (дзета) (CD3 $\zeta$  человека: UniProtKB/Swiss-Prot No. P20963, CD3 $\zeta$  яванского макака: UniProtKB/Swiss-Prot No. Q09TK0). Эти цепи ассоциированы с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR и CD3 вместе составляют комплекс TCR.

“Антитело к CD3” или “антитело против CD3” означает антитело, которое специфически связывается с антигеном CD3, в частности, с CD3 $\epsilon$  (эпсилон) человека.

Термин “CD20 человека” или “CD20” означает CD20 человека (UniProtKB/Swiss-Prot No. P11836) и включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи CD20, которые естественным образом экспрессируются в клетках, включая опухолевые клетки, либо экспрессируются в клетках, трансфицированных геном или кДНК CD20. Видовые гомологи включают CD20 макаки-резус (*Macaca mulatta*: UniProtKB/Swiss-Prot No. H9YXP1) и CD20 яванского макака (*Macaca fascicularis*: UniProtKB No. G7PQ03).

“Антитело к CD20” или “антитело против CD20” означает антитело, которое специфически связывается с антигеном CD20, в частности, с CD20 человека.

“Антитело к CD3хCD20”, “антитело против CD3хCD20”, антитело к CD20хCD3” или “антитело против CD20хCD3” означает такое биспецифичное антитело, которое содержит две различные антигенсвязывающие области, одна из которых специфически связывается с антигеном CD20, а другая специфически связывается с CD3.

В настоящем описании термин “дуотело CD3хCD20” означает биспецифичное антитело IgG1 к CD3хCD20, в котором Fab-плечо, связывающее CD3, содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, константную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 22 и константную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а Fab-плечо, связывающее CD20, содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, константную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 23 и константную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR). Это биспецифичное антитело может быть получено, как описано в WO 2016/110576.

В предпочтительном воплощении биспецифичное антитело по изобретению является выделенным. “Выделенное биспецифичное антитело” в настоящем изобретении означает такое биспецифичное антитело, которое практически не содержит других антител

с другой антигенной специфичностью (к примеру, выделенное биспецифичное антитело, которое специфически связывается с CD20 и CD3, практически не содержит моноспецифичных антител, специфически связывающихся с CD20 или CD3).

Настоящим изобретением также предусмотрены антитела, содержащие функциональные варианты областей  $V_L$ , областей  $V_H$  либо одного или нескольких CDR у антител из примеров. Функциональные варианты  $V_L$ ,  $V_H$  или CDR в применении к антителам все же позволяют антителам сохранять значительную долю (по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше) сродства и/или специфичности/избирательности от “эталонного” или “исходного” антитела, а в некоторых случаях такие антитела могут быть связаны с большим сродством, избирательностью и/или специфичностью, чем исходное антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности с исходным антителом. Степень идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений у этих последовательностей (т.е. % гомологии = число идентичных положений/общее число положений  $\times 100$ ) с учетом количества пробелов и длины каждого пробела, которые нужно

вести для оптимального совмещения двух последовательностей. Степень идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, напр., с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11-17 (1988), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя матрицу весов остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Кроме того, степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Примеры вариантов включают такие, которые отличаются от VH и/или VL и/или участков CDR в последовательности исходного антитела главным образом консервативными заменами; например, 10, например, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замена у варианта являются консервативными заменами аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены можно определить как замены в пределах классов аминокислот, приведенных в следующей таблице.

#### Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

В настоящем описании для описания мутаций применяются следующие обозначения, если не указано иначе: i) замена аминокислоты в данном положении записывается, напр., как K409R, что означает замену лизина в положении 409 на аргинин; и ii) для определенных вариантов применяются определенные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X для обозначения любого аминокислотного остатка. Так, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина на любой аминокислотный остаток в положении 409 обозначается как K409X. В случае делеции лизина в положении 409 это обозначается как K409\*.

В настоящем описании “конкуренция” (или “блокирование” или “перекрестная блокировка”) означает значительное снижение способности определенной молекулы к связыванию с определенным партнером по связыванию в присутствии другой молекулы, связывающейся с этим партнером по связыванию. Конкуренцию за связывание с CD20 между двумя или несколькими антителами против CD20 можно определить любым подходящим методом.

Термин “эпитоп” означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных группировок

молекул, например, аминокислот или боковых цепей сахаров и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не со вторыми, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может включать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, например, таких аминокислотных остатков, которые эффективно блокируются или закрываются пептидом, специфически связывающимся с антигеном (иными словами, эти аминокислотные остатки находятся в пределах “отпечатка” пептида, специфически связывающегося с антигеном).

Термин “химерное антитело” в настоящем изобретении означает такое антитело, в котором переменная область происходит из вида, отличного от человека (напр., из грызунов), а константная область происходит из другого вида, например, человека. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разрабатываются для снижения иммуногенности антител. Термины “переменная область” или “переменный домен” в применении к химерным антителам означают область, которая включает участки CDR и каркасные участки тяжелых либо легких цепей иммуноглобулина. Химерные антитела могут быть получены единичными методами ДНК, как описано в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Химерные антитела могут представлять собой генетически или энзиматически сконструированные рекомбинантные антитела. Получение химерных антител находится в компетенции специалистов, поэтому получение химерных антител по настоящему изобретению может проводиться и другими способами, чем описано здесь.

Термин “гуманизованное антитело” в настоящем изобретении означает такое генетически сконструированное нечеловеческое антитело, которое содержит константные домены человеческого антитела и нечеловеческие переменные домены, модифицированные так, чтобы обеспечить высокий уровень гомологии последовательностей с переменными доменами человека. Это достигается путем пересадки 6 определяющих комплементарность участков (CDR) антител не человека, которые совместно образуют антигенсвязывающий сайт, в гомологичные акцепторные каркасные участки (FR) человека (см. WO 92/22653 и EP 0629240). Для того, чтобы полностью воспроизвести сродство связывания и специфичность исходного антитела, может потребоваться замена каркасных остатков от исходного антитела (т.е. не человеческого антитела) на каркасные участки человека (обратные мутации).

Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать те аминокислотные остатки в каркасных участках, которые важны для связывающих свойств антитела. Так, гуманизованное антитело может содержать последовательности CDR не от человека, каркасные участки в основном от человека, необязательно содержащие одну или несколько обратных мутаций аминокислот в аминокислотную последовательность не человека, и константные области полностью от человека. Необязательно для получения гуманизованных антител с предпочтительными характеристиками, например, сродства и биохимических свойств могут применяться и другие аминокислотные модификации, которые не обязательно являются обратными мутациями.

Термин “человеческое антитело” в настоящем изобретении обозначает антитела, у которых переменные и константные области происходят из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие антитела могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые гаметными последовательностями иммуноглобулина человека (напр., мутации, введенные путем случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или при соматических мутациях *in vivo*). Однако термин “человеческое антитело” в настоящем описании не включает такие антитела, полученные привитием в каркасные последовательности человека последовательностей CDR, полученных из зародышевых линий других видов млекопитающих, например, мышей. Человеческие моноклональные антитела по изобретению могут быть получены различными методами, включая единичные методы получения моноклональных антител, напр., единичный метод гибридизации соматических клеток по Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975). Хотя методы гибридизации соматических клеток и предпочтительны, но в принципе можно использовать и другие методы получения моноклональных антител, напр., методы вирусной или онкогенной трансформации В-лимфоцитов или методы фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека. Подходящей системой на животных для получения гибридом, секретирующих человеческие моноклональные антитела, является мышьяная система. Получение гибридом на мышьях – очень хорошо поставленная процедура. В данной области известны методики иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния. Также известны партнеры по слиянию (напр., клетки мышьяной миеломы) и процедуры слияния. Так, человеческие моноклональные антитела могут быть получены, напр., с использованием трансгенных или трансхромосомных мышьях или крыс, несущих части иммунной системы человека, а не системы мышьях или крыс. Соответственно, в одном воплощении человеческие антитела получают от трансгенных животных, например, мышьях или крыс, несущих гаметные последовательности иммуноглобулина человека

вместо последовательностей иммуноглобулинов животных. В таких воплощениях антитела происходят из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека, введенных животному, но конечная последовательность антител является результатом дальнейшей модификации таких гаметных последовательностей иммуноглобулина человека за счет соматических гипермутаций и созревания аффинности антител по эндогенным механизмам у животных, например, см. Mendez et al. 1997 Nat Genet. 15(2):146-56. Термин “восстановительные условия” или “восстановительная среда” означает такие условия или среды, при которых субстрат, в данном случае остаток цистеина в шарнирной области антитела, с большей вероятностью восстанавливается, чем окисляется.

Термин “рекомбинантная клетка-хозяин” (или просто “клетка-хозяин”) в настоящем изобретении служит для обозначения клеток, в которые был введен экспрессирующий вектор, напр., экспрессирующий вектор, кодирующий антитело по изобретению. Рекомбинантные клетки хозяина включают, к примеру, трансфектомы, например, клеток CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 или NS0 и лимфоцитарные клетки.

Термин “лечение” означает введение эффективного количества терапевтически активного антитела по настоящему изобретению с целью облегчения, ослабления, купирования или устранения (излечения) симптомов или заболеваний.

Термин “эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” означает такое количество, которое эффективно, в дозах и в течение необходимого времени, для достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как заболевание, возраст, пол и вес индивида, а также от способности антитела вызывать требуемые реакции у индивида. Терапевтически эффективное количество также означает такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела перевешиваются его терапевтически полезным действием.

Термин “буфер” в настоящем изобретении означает фармацевтически приемлемый буфер. Термин “буфер” охватывает такие вещества, которые поддерживают значение pH раствора, напр., в приемлемом диапазоне, и включает, без ограничения, ацетат, гистидин, TRIS<sup>®</sup> (трис(гидроксиэтил)аминометан), цитрат, сукцинат, гликолат и т.п. Как правило, используемый здесь “буфер” имеет pKa и буферную емкость, подходящие для диапазона pH от 5 до 6, предпочтительно 5,5.

“Поверхностно-активное вещество” (ПАВ) означает соединение, которое обычно применяется в лекарственных формах для предотвращения адсорбции препарата на

поверхности и/или агрегации. Кроме того, ПАВ снижают поверхностное натяжение (или межфазное натяжение) между двумя жидкостями или между жидкостью и твердым телом. Например, типичные ПАВ могут значительно уменьшить поверхностное натяжение при очень низких концентрациях (напр., 5% мас./об. или меньше, например, 3% мас./об. или меньше, например, 1% мас./об. или меньше, например, 0,4% мас./об. или меньше, например, менее 0,1% мас./об. или меньше, например, 0,04% мас./об.). Поверхностно-активные вещества являются амфифильными, а это значит, что они обычно состоят из гидрофильных и гидрофобных или липофильных групп, способных при этом образовывать мицеллы либо аналогичные самосборочные структуры в водных растворах. Известные ПАВ для фармацевтического применения включают глицерин моноолеат, бензетоний хлорид, докюзат натрия, фосфолипиды, полиэтиленалкиловые эфиры, лаурилсульфат натрия и трикаприлин (анионные ПАВ); бензалконий хлорид, цетримид, цетилпиридиний хлорид и фосфолипиды (катионные ПАВ); и  $\alpha$ -токоферол, глицерин моноолеат, миристиловый спирт, фосфолипиды, полноксамеры, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, полиоксиэтиленовые производные касторового масла, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, полиоксиэтиленстеараты, полиоксилгидроксистеарат, полиоксилглицериды, полисорбаты, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, пропиленгликольдилаурат, пропиленгликольмонолаурат, сложные сорбитановые эфиры сахарозы и пальмитата, сахарозы и стеарата, трикаприлин и TPGS (неионные и цвиттерионные ПАВ).

Представляющий интерес “разбавитель” является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным при введении людям) и пригодным для приготовления разведений фармацевтических композиций. Предпочтительно при таких разведениях композиций по изобретению разбавляется только концентрация антитела, но не буфера или стабилизатора. Соответственно, в предпочтительном воплощении разбавитель содержит такие же концентрации буфера и стабилизатора, что и фармацевтическая композиция по изобретению. Другие типичные разбавители – стерильная вода, бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор, которым предпочтительно является ацетатный буфер, стерильный физраствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. В предпочтительном воплощении разбавитель включает или содержит ацетатный буфер и сорбитол.

Термины “фармацевтическая композиция” и “лекарственная форма” применяются здесь взаимозаменяемым образом.

### **Конкретные воплощения изобретения**

В одном основном аспекте изобретения предусмотрены фармацевтические

композиции, включающие или состоящие в основном из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела, связывающегося с CD3 человека и с CD20 человека,
- b) 20-40 mM ацетата,
- c) 140-160 mM сорбитола,
- d) поверхностно-активного вещества,

причем значение pH композиции составляет от 5 до 6, а биспецифичное антитело содержит первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12.

В другом основном аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела, связывающегося с CD3 человека и с CD20 человека,
- b) 20-40 mM ацетата,
- c) 140-160 mM сорбитола,
- d) 0,03-0,05% мас./об. полисорбата 80,

причем значение pH композиции составляет от 5 до 6, а биспецифичное антитело содержит первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 1, VH-CDR2: SEQ ID NO: 2, VH-CDR3: SEQ ID NO: 3, VL-CDR1: SEQ ID NO: 4, VL-CDR2: GTN, и VL-CDR3: SEQ ID NO: 5, и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает

последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 8, VH-CDR2: SEQ ID NO: 9, VH-CDR3: SEQ ID NO: 10, VL-CDR1: SEQ ID NO: 11, VL-CDR2: DAS, и VL-CDR3: SEQ ID NO: 12.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, состоящие в основном из:

a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела, связывающегося с CD3 человека и с CD20 человека,

b) 20-40 mM ацетата,

c) 140-160 mM сорбитола,

d) 0,03-0,05% мас./об. полисорбата 80,

причем значение pH композиции составляет от 5 до 6, а биспецифичное антитело содержит первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 1, VH-CDR2: SEQ ID NO: 2, VH-CDR3: SEQ ID NO: 3, VL-CDR1: SEQ ID NO: 4, VL-CDR2: GTN, и VL-CDR3: SEQ ID NO: 5, и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 8, VH-CDR2: SEQ ID NO: 9, VH-CDR3: SEQ ID NO: 10, VL-CDR1: SEQ ID NO: 11, VL-CDR2: DAS, и VL-CDR3: SEQ ID NO: 12.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, состоящие из:

a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела, связывающегося с CD3 человека и с CD20 человека,

b) 20-40 mM ацетата,

c) 140-160 mM сорбитола,

d) 0,03-0,05% мас./об. полисорбата 80,

причем значение pH композиции составляет от 5 до 6, а биспецифичное антитело содержит первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 1, VH-CDR2: SEQ ID NO: 2, VH-CDR3: SEQ ID NO: 3, VL-CDR1: SEQ ID NO: 4, VL-CDR2: GTN, и VL-CDR3: SEQ ID NO: 5, и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 8, VH-CDR2: SEQ ID NO: 9, VH-CDR3: SEQ ID NO: 10, VL-CDR1: SEQ ID NO: 11, VL-CDR2: DAS, и VL-CDR3: SEQ ID NO: 12.

Итак, предусмотрены простые, но стабильные фармацевтические композиции. Преимуществом настоящего изобретения является то, что композиции пригодны как для внутривенного введения, так и для подкожного введения. Другим преимуществом является то, что композиции стабильны, в частности, биспецифичные антитела стабильны в широком диапазоне концентраций антител, так что одни и те же составы можно

использовать для клинических испытаний фазы I с повышением дозы, когда концентрация антител в композиции варьируется от 4 мкг/мл до 120 мг/мл или даже выше, и те же композиции можно использовать для дальнейших стадий клинических испытаний и даже для окончательного коммерческого состава. Неожиданно оказалось, что такие композиции стабильны в таком широком диапазоне концентраций антител при температурах от 2° до 25°C и даже при более высоких температурах. Композиции по изобретению стабильны в течение по меньшей мере 3 месяцев, например, 6 месяцев или даже 9 месяцев либо 12 месяцев при хранении при температуре от 2°C до 8°C.

В одном воплощении композиций по изобретению первая область связывания биспецифичных антител, связывающаяся с CD3, включает последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> согласно SEQ ID NO: 6 и 7.

В другом воплощении композиций по изобретению вторая область связывания биспецифичных антител, связывающаяся с CD20, включает последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> согласно SEQ ID NO: 13 и 14.

В следующем воплощении фармацевтических композиций по изобретению биспецифичным антителом является дуотело CD3xCD20.

В предпочтительном воплощении композиции по изобретению биспецифичное антитело представляет собой антитело IgG1. Но, с другой стороны, биспецифичное антитело может представлять собой антитело изотипа IgG2, IgG3 или IgG4 либо комбинацию IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Например, первая тяжелая цепь может быть изотипа IgG1, а вторая тяжелая цепь может быть изотипа IgG4.

В следующем воплощении композиций по изобретению биспецифичное антитело содержит Fc-область, включающую первую и вторую тяжелую цепь, причем такая Fc-область была модифицирована так, чтобы её эффекторные функции были снижены по сравнению с биспецифичным антителом, содержащим Fc-область IgG1 дикого типа. При этом биспецифичное антитело будет обладать меньшей способностью к связыванию с Fc-γ-рецепторами человека и компонентом C1q комплемента человека, что приведет к снижению способности индуцировать опосредованные Fc эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Соответственно, биспецифичное антитело по изобретению с пониженными эффекторными функциями будет активировать Т-клетки только в присутствии клеток, экспрессирующих CD20. Иными словами, такие биспецифичные антитела не будут индуцировать опосредованное антителами FcR-зависимое сшивание CD3 и последующую независимую от мишени активацию Т-клеток.

В другом воплощении фармацевтических композиций по изобретению биспецифичное антитело содержит Fc-область, которая была модифицирована так, чтобы связывание C1q с данным антителом снижалось по сравнению с биспецифичным антителом, содержащим Fc-область IgG1 дикого типа, по меньшей мере на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 97% или на 100% при определении связывания C1q методом ELISA.

Биспецифичные антитела, описанные здесь, могут быть получены на платформе технологии DuoBody<sup>®</sup> (Genmab A/S), как описано, напр., в WO 2011/131746 и в Labrijn AF et al. (2013) PNAS 110(13): 5145-5150. По технологии DuoBody можно соединить одну половинку первого моноспецифичного антитела, содержащего две тяжелые и две легкие цепи, с одной половинкой второго моноспецифичного антитела, содержащего две

тяжелые и две легкие цепи. Полученный гетеродимер содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь от первого антитела в паре с одной тяжелой цепью и одной легкой цепью от второго антитела. Если первое и второе моноспецифичное антитело распознают разные эпитопы на разных антигенах, например, CD3 и CD20, то полученный гетеродимер представляет собой биспецифичное антитело против CD3 и CD20.

Технология DuoBody требует, чтобы каждое из моноспецифичных антител содержало константную область тяжелой цепи с одной точечной мутацией в домене СН3. Эти точечные мутации обеспечивают более сильное взаимодействие между доменами СН3 в полученном биспецифичном антителе, чем между доменами СН3 в любом из моноспецифичных антител. Эти точечные мутации в каждом из моноспецифичных антител приходятся на остатки 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409 в домене СН3 константной области тяжелой цепи по системе нумерации EU, как описано, напр., в WO 2011/131746. Более того, эти точечные мутации приходятся на разные остатки у одного моноспецифичного антитела по сравнению с другим моноспецифичным антителом. Например, одно моноспецифичное антитело может содержать мутацию F405L (т.е. мутацию фенилаланина на лейцин по остатку 405), тогда как другое моноспецифичное антитело может содержать мутацию K409R (т.е. мутацию лизина на аргинин по остатку 409). Константные области тяжелой цепи моноспецифичных антител могут иметь изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (напр., изотип IgG1 человека), а биспецифичное антитело, полученное по технологии DuoBody, может сохранять опосредованные Fc эффекторные функции или же можно подвергнуть Fc-область дополнительным мутациям для снижения опосредованных Fc эффекторных функций, как описано здесь.

Fc-область может содержать лизин на своем C-конце. Этот лизин происходит из природной последовательности от людей, у которых встречаются такие Fc-области. При

получении рекомбинантных антител в клеточной культуре этот концевой лизин может отщепляться при протеолизе под действием эндогенных карбоксипептидаз, при этом образуется константная область с такой же последовательностью, но лишенная C-концевого лизина. Для процесса получения антител можно удалить из последовательности ДНК, кодирующую этот концевой лизин, с тем, чтобы вырабатывались антитела без этого лизина. Антитела, полученные из последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих либо не кодирующих концевой лизин, практически идентичны по последовательности и по функции, так как степень процессинга этого концевого лизина обычно велика при использовании, напр., антител, получаемых в системах продукции на основе клеток CHO (Dick L.W. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2008, 100:1132-1143).

Соответственно, в другом воплощении фармацевтических композиций по изобретению биспецифичное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, каждая из которых включает как минимум шарнирную область и области CH2 и CH3, причем в данной первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, а в данной второй тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 (по системе нумерации EU) в тяжелой цепи IgG1 человека, причем замены в данной первой и данной второй тяжелых цепях находятся не в одинаковых положениях.

В следующем воплощении фармацевтических композиций по изобретению (i) в первой тяжелой цепи биспецифичного антитела аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена L, а во второй тяжелой цепи биспецифичного антитела аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена R, либо (ii) в первой тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена R, а во второй тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена L.

В одном воплощении биспецифичное антитело в фармацевтических композициях может включать дополнительные замены и в константной области первой тяжелой цепи, и в константной области второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека (по системе нумерации EU), а именно замены L234 на F (L234F) и замены L235 на E (L235E). При этом снижаются опосредованные Fc эффекторные функции антитела.

В другом воплощении биспецифичное антитело в фармацевтических композициях может включать дополнительные замены и в константной области первой тяжелой цепи, и в константной области второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положении, соответствующем D265 в IgG1 человека, а именно замены D265 на A (D265A).

В другом воплощении биспецифичное антитело в фармацевтических композициях включает три замены L234F+L235E+D265A в константной области как первой, так и второй тяжелой цепи биспецифичного антитела.

В следующем воплощении биспецифичное антитело в фармацевтических композициях включает три замены L234F+L235E+D265A в константной области как первой, так и второй тяжелой цепи биспецифичного антитела, причем константная область первой тяжелой цепи дополнительно содержит замену F405L, а константная область второй тяжелой цепи дополнительно содержит замену K409R или наоборот. При этом константная область первой тяжелой цепи содержит замены L234F+L235E+D265A+F405L (которые также описаны здесь как мутации "FEAL"), а константная область второй тяжелой цепи содержит замены L234F+L235E+D265A+K409R (которые также описаны здесь как мутации "FEAR"), или же константная область первой тяжелой цепи содержит замены L234F+L235E+D265A+K409R, а константная область второй тяжелой цепи содержит замены L234F+L235E+D265A+F405L. В предпочтительном воплощении константные области и первой, и второй тяжелой цепи биспецифичного антитела относятся к изолипу IgG1, но содержат замены L234F+L235E+D265A+F405L и L234F+L235E+D265A+K409R, соответственно.

Соответственно, в одном воплощении изобретения биспецифичное антитело в фармацевтических композициях содержит константную область первой тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 и константную область второй тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 или же оно содержит константную область первой тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 и константную область второй тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19. В другом воплощении биспецифичное антитело содержит константные области тяжелой цепи, которые по последовательности по меньшей мере на 90%, например, на 91%, например, на 92%, например, на 93%, например, на 94%, например, на 95%, например, на 96%, например, на 97%, например, на 98%, например, на 99% идентичны аминокислотным последовательностям согласно SEQ ID NO: 19 и 20, соответственно, но содержат аминокислоты FEAR или FEAL, как описано выше.

Первая и вторая легкие цепи биспецифичного антитела в композициях предпочтительно также содержат константные области первой и второй легкой цепи. Константная область легкой цепи может относиться к подтипу лямбда или каппа. В

предпочтительном воплощении изобретения константная область легкой цепи связывающего CD3 плеча относится к подтипу лямбда, а константная область легкой цепи связывающего CD20 плеча относится к подтипу каппа. В одном воплощении легкая цепь (VL+CL) связывающего CD3 плеча имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 24, а легкая цепь связывающего CD20 плеча имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 25.

В другом очень предпочтительном воплощении биспецифичное антитело против CD3xCD20 в фармацевтических композициях, способах, применениях и единичных дозовых формах, как описано здесь, содержит первое связывающее плечо, включающее область связывания, связывающуюся с CD3 человека, и содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и второе связывающее плечо, включающее область связывания, связывающуюся с CD3 человека, и содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно. Эти цепи содержат последовательности CDR, VH и VL, приведенные в SEQ ID NO:1-14, и константные области, соответствующие SEQ ID NO: 19, 20, 22 и 23. Также предусмотрены варианты таких антител в фармацевтических композициях, способах, применениях и единичных дозовых формах, как описано здесь. В следующем воплощении биспецифичное антитело по изобретению представляет собой эпоритамаб (CAS 2134641-34-0) или его биоаналог.

Концентрация биспецифичного антитела в фармацевтических композициях может составлять от 0,5 мг/мл до 200 мг/мл. В одном воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 0,5 до 120 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 1 до 110 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 1 до 60 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 5 до 30 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 10 до 30 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 12 до 24 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет 5 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет 6 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет 7 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет 8 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет 9 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет 10 мг/мл. В другом



изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 50 до 110 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 50 до 100 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 50 до 90 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 50 до 80 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела составляет от 50 до 70 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 60 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 70 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 80 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 90 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 100 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 110 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 120 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 130 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 140 мг/мл. В другом воплощении изобретения концентрация биспецифичного антитела в фармацевтической композиции составляет 150 мг/мл.

Фармацевтические композиции по изобретению содержат ацетатный буфер, который применяется для контролирования рН в диапазоне, оптимизирующем терапевтическую эффективность и стабильность биспецифичного антитела. Ацетатный буфер можно получить смешиванием ацетата натрия тригидрата с уксусной кислотой в воде для инъекций. Можно доводить рН добавлением гидроксида натрия. В одном воплощении ацетатный буфер присутствует в концентрации от 20 мМ до 40 мМ. В одном воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 20 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 25 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 26 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 27 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 28 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 29 мМ. В другом

воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 30 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 31 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 32 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 33 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 34 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 35 мМ. В другом воплощении изобретения концентрация ацетатного буфера в композиции составляет 40 мМ. В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции могут содержать и другие буферы. В другом воплощении фармацевтические композиции не содержат других буферов. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что ацетатный буфер неожиданно хорошо подходит для стабилизации биспецифичных антител по сравнению с гистидиновым буфером. Было обнаружено, что при хранении биспецифичного антитела по изобретению 8 недель при 40°C в 30 мМ гистидиновом буфере рН 5,5 образовалось 14,2% высокомолекулярных частиц, тогда как при хранении 8 недель при 40°C в 30 мМ ацетатном буфере рН 5,5 образовалось только 5,8% высокомолекулярных частиц (см. пример 3).

В одном воплощении изобретения значение рН фармацевтических композиций составляет от 5 до 6. Понятно, что предпочтительно фармацевтические композиции должны содержать подходящий для них буфер. В другом воплощении изобретения значение рН фармацевтических композиций составляет от 5,2 до 5,8. В другом воплощении изобретения значение рН фармацевтических композиций составляет от 5,3 до 5,5. В другом воплощении изобретения значение рН фармацевтических композиций составляет от 5,4 до 5,6. В другом воплощении изобретения значение рН фармацевтических композиций составляет 5,5. В другом воплощении изобретения значение рН фармацевтических композиций составляет 5,4.

Фармацевтические композиции по изобретению также содержат полиол в качестве “стабилизатора”, который может взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая возможность меж- и внутримолекулярных взаимодействий. Предпочтительно фармацевтические композиции по изобретению в качестве “стабилизатора” содержат сорбитол, который может взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая возможность меж- и внутримолекулярных взаимодействий. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтических композициях в концентрации от 100 мМ до 250 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтических композициях в

концентрации от 150 мМ до 250 мМ. В другом воплощении сорбитол присутствует в концентрации от 130 мМ до 200 мМ. В другом воплощении сорбитол присутствует в концентрации от 140 мМ до 160 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 140 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 145 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 146 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 147 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 148 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 149 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 150 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 151 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 152 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 153 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 154 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 155 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 160 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 170 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 180 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 190 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 200 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 210 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 220 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 230 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 240 мМ. В одном воплощении сорбитол присутствует в фармацевтической композиции в концентрации 250 мМ.

Как уже было сказано, фармацевтические композиции по изобретению также могут содержать полиол в качестве “стабилизатора”, который может взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая возможность меж- и внутримолекулярных взаимодействий. В одном воплощении полиол присутствует в фармацевтических композициях в концентрации от 100 мМ до 300 мМ. В одном воплощении полиол присутствует в фармацевтических композициях в концентрации от

140 мМ до 260 мМ. В другом воплощении полиол присутствует в концентрации от 130 мМ до 200 мМ. В другом воплощении полиол присутствует в концентрации от 140 мМ до 160 мМ. В другом воплощении полиол присутствует в концентрации от 240 мМ до 260 мМ.

В одном воплощении осмоляльность (мОсм/кг) фармацевтических композиций составляет 200 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 210 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 220 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 230 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 240 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 250 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 260 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 270 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 280 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 290 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 300 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 310 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 320 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 330 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 340 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 350 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 360 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 370 мОсм/кг. В другом воплощении осмоляльность фармацевтических композиций составляет 380 мОсм/кг.

Предпочтительно осмоляльность может составлять, напр., менее 600 мОсм/кг, так как общепризнанно, что это хорошо переносится при подкожном введении. Поэтому в другом воплощении осмоляльность (мОсм/кг) фармацевтических композиций составляет 200-600 мОсм/кг, более предпочтительно 200-450 мОсм/кг. В одном воплощении осмоляльность составляет в пределах 220-380 мОсм/кг.

В одном воплощении изобретения соотношение концентраций ацетатного буфера и сорбитола в фармацевтических композициях составляет от 1:5 до 1:10. В одном воплощении изобретения соотношение концентраций ацетатного буфера и сорбитола составляет 1:5. В другом воплощении изобретения соотношение концентраций ацетатного

буфера и сорбитола составляет 1:6. В другом воплощении изобретения соотношение концентраций ацетатного буфера и сорбитола составляет 1:7. В другом воплощении изобретения соотношение концентраций ацетатного буфера и сорбитола составляет 1:8. В другом воплощении изобретения соотношение концентраций ацетатного буфера и сорбитола составляет 1:9. В другом воплощении изобретения соотношение концентраций ацетатного буфера и сорбитола составляет 1:10.

Фармацевтические композиции по изобретению также содержат поверхностно-активное вещество (ПАВ). В одном воплощении ПАВ выбирают из группы, включающей глицерин моноолеат, бензетоний хлорид, докузат натрия, фосфолипиды, полиэтиленалкиловые эфиры, лаурилсульфат натрия и трикаприлин, бензалконий хлорид, цетримид, цетилпиридиний хлорид, фосфолипиды,  $\alpha$ -токоферол, глицерин моноолеат, миристиловый спирт, фосфолипиды, полочсамеры, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, полиоксиэтиленовые производные касторового масла, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, полиоксиэтиленстеараты, полиоксил-гидроксистеарат, полиоксил-глицериды, полисорбаты, пропиленгликольдилаурат, пропиленгликольмонолаурат, сложные сорбитановые эфиры сахарозы и пальмитата, сахарозы и стеарата, трикаприлин и TPGS.

В одном предпочтительном воплощении ПАВ представляет собой полисорбат. В одном воплощении ПАВ представляет собой полисорбат 20. В другом предпочтительном воплощении это полисорбат 80.

В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации от 0,01 до 0,1% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации от 0,01 до 0,09% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации от 0,01 до 0,06% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации от 0,01 до 0,05% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации 0,01% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации 0,02% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации 0,03% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации 0,04% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ содержится в концентрации 0,05% мас./об. В одном воплощении изобретения ПАВ представляет собой полисорбат 80 в концентрации 0,04% мас./об. Авторы изобретения обнаружили, что включение ПАВ улучшает физическую стабильность биспецифичного антитела и значительно снижает уровень видимых частиц. Это оказалось более важным для крупных партий композиций, чем для мелких партий.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 20-40 мМ ацетата,
- c) 140-160 мМ сорбитола,
- d) 0,005-0,4% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят в основном из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 20-40 мМ ацетата,
- c) 140-160 мМ сорбитола,
- d) 0,005-0,4% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 20-40 мМ ацетата,
- c) 140-160 мМ сорбитола,
- d) 0,005-0,4% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

- a) 5-60 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,05% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и

состоят в основном из:

a) 5-60 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 мМ ацетата,

c) 145-155 мМ сорбитола,

d) 0,02-0,05% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят в основном из:

a) 10-50 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 мМ ацетата,

c) 145-155 мМ сорбитола,

d) 0,02-0,05% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят в основном из:

a) 12-24 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 мМ ацетата,

c) 145-155 мМ сорбитола,

d) 0,02-0,05% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а

связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В другом воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят в основном из:

- a) 5-60 мг/мл биспецифичного антитела, например, от 10 до 50 мг/мл, например, от 12 до 24 мг/мл,
- b) 30 мМ ацетатного буфера,
- c) 150 мМ сорбитола,
- d) 0,04% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- e) 5-60 мг/мл биспецифичного антитела,
- f) 28-32 мМ ацетата,
- g) 145-155 мМ сорбитола,
- h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- e) 10-50 мг/мл биспецифичного антитела,
- f) 28-32 мМ ацетата,
- g) 145-155 мМ сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

e) 12-24 мг/мл биспецифичного антитела,

f) 28-32 мМ ацетата,

g) 145-155 мМ сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В другом воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

e) 5-60 мг/мл биспецифичного антитела, например, от 10 до 50 мг/мл, например, от 12 до 24 мг/мл,

f) 30 мМ ацетатного буфера,

g) 150 мМ сорбитола,

h) 0,04% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем связывающее CD3 Fab-плечо биспецифичного антитела содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 (FEAL), а связывающее CD20 Fab-плечо содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, и последовательность константной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 20 (FEAR).

В одном воплощении фармацевтические композиции представляют собой концентрированный лекарственный продукт (DuoBody CD3xCD20), составленный в 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, pH 5,5, и 0,04% мас./об. полисорбата 80. Концентрат перед введением можно разводить с помощью разбавителя, получая концентрации от 2 мкг/мл до 24 мг/мл биспецифичного антитела. Концентрат можно разводить за день до введения с помощью разбавителя, получая концентрации от 2 мкг/мл до 24 мг/мл биспецифичного антитела. Концентрат можно разводить в день введения перед введением с помощью разбавителя, получая концентрации от 2 мкг/мл до 24 мг/мл биспецифичного антитела. Концентрат можно разводить непосредственно перед введением с помощью разбавителя, получая концентрации от 2 мкг/мл до 24 мг/мл биспецифичного антитела. В одном воплощении состав разбавителя: 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, pH 5,5, и 0,04% мас./об. полисорбата 80. Предусматриваются и другие подходящие фармацевтически приемлемые разбавители, как описано здесь.

В другом воплощении разбавителем является коммерчески доступный разбавитель. Наиболее предпочтительным разбавителем является раствор хлористого натрия, например, 0,9% NaCl в воде, пригодный для инъекций. Такой разбавитель наиболее подходит для разведения биспецифичных антител к CD3xCD20, содержащихся в фармацевтических композициях, например, описанных здесь. Например, 0,9% раствор хлорида натрия в воде, подходящий для инъекций, можно использовать для разбавления эпкоритамаба, содержащегося в фармацевтическом растворе в соответствии с изобретением.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят в основном из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 мМ ацетата,

c) 145-155 мМ сорбитола,

d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 мМ ацетата,

c) 145-155 мМ сорбитола,

d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

a) 2-8 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 мМ ацетата,

c) 145-155 мМ сорбитола,

d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

a) 2-8 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 мМ ацетата,

c) 145-155 мМ сорбитола,

d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

a) 40-80 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 mM ацетата,

c) 145-155 mM сорбитола,

d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

a) 40-80 мг/мл биспецифичного антитела,

b) 28-32 mM ацетата,

c) 145-155 mM сорбитола,

d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

a) 0,5-120 мг/мл эпкоритамаба,

b) 28-32 mM ацетата,

c) 145-155 mM сорбитола,

d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

- a) 0,5-120 мг/мл эпкоритамаба,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

- a) 2-8 мг/мл эпкоритамаба,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

- a) 2-8 мг/мл эпкоритамаба,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

- a) 40-80 мг/мл эпкоритамаба,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

- a) 40-80 мг/мл эпкоритамаба,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- a) 5, 48 или 60 мг/мл эпокоритамаба,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- i) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- j) 28-32 мМ ацетата,
- k) 145-155 мМ сорбитола,
- l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

- e) 2-8 мг/мл биспецифичного антитела,
- f) 28-32 мМ ацетата,
- g) 145-155 мМ сорбитола,
- h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- e) 2-8 мг/мл биспецифичного антитела,
- f) 28-32 мМ ацетата,
- g) 145-155 мМ сорбитола,
- h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например,

полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

e) 40-80 мг/мл биспецифичного антитела,

f) 28-32 mM ацетата,

g) 145-155 mM сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

e) 40-80 мг/мл биспецифичного антитела,

f) 28-32 mM ацетата,

g) 145-155 mM сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

e) 0,5-120 мг/мл эпкоритамаба,

f) 28-32 mM ацетата,

g) 145-155 mM сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и

состоят из:

e) 0,5-120 мг/мл эпкоритамаба,

f) 28-32 мМ ацетата,

g) 145-155 мМ сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

e) 2-8 мг/мл эпкоритамаба,

f) 28-32 мМ ацетата,

g) 145-155 мМ сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

e) 2-8 мг/мл эпкоритамаба,

f) 28-32 мМ ацетата,

g) 145-155 мМ сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

e) 40-80 мг/мл эпкоритамаба,

f) 28-32 мМ ацетата,

g) 145-155 мМ сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

e) 40-80 мг/мл эпкоритамаба,

f) 28-32 мМ ацетата,

g) 145-155 мМ сорбитола,

h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и

состоят из:

- e) 5, 48 или 60 мг/мл эпкоритамаба,
- f) 28-32 мМ ацетата,
- g) 145-155 мМ сорбитола,
- h) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- m) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- n) 28-32 мМ ацетата,
- o) 140-260 мМ сорбитола,
- p) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

- i) 2-8 мг/мл биспецифичного антитела,
- j) 28-32 мМ ацетата,
- k) 140-260 мМ сорбитола,
- l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- i) 2-8 мг/мл биспецифичного антитела,
- j) 28-32 мМ ацетата,
- k) 140-260 мМ сорбитола,
- l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

- i) 40-80 мг/мл биспецифичного антитела,
- j) 28-32 мМ ацетата,
- k) 140-260 мМ сорбитола,
- l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

- i) 40-80 мг/мл биспецифичного антитела,
- j) 28-32 мМ ацетата,
- k) 140-260 мМ сорбитола,
- l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80,

причем биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и содержат:

- i) 0,5-120 мг/мл эпоритамаба,
- j) 28-32 мМ ацетата,
- k) 140-260 мМ сорбитола,
- l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют pH 5,5 и состоят из:

i) 0,5-120 мг/мл эпкоритамаба,

j) 28-32 мМ ацетата,

k) 140-260 мМ сорбитола,

l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

i) 2-8 мг/мл эпкоритамаба,

j) 28-32 мМ ацетата,

k) 140-260 мМ сорбитола,

l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

i) 2-8 мг/мл эпкоритамаба,

j) 28-32 мМ ацетата,

k) 140-260 мМ сорбитола,

l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и содержат:

i) 40-80 мг/мл эпкоритамаба,

j) 28-32 мМ ацетата,

k) 140-260 мМ сорбитола,

l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

i) 40-80 мг/мл эпкоритамаба,

j) 28-32 мМ ацетата,

k) 140-260 мМ сорбитола,

l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции имеют рН 5,5 и состоят из:

- i) 5, 48 или 60 мг/мл эпкоритамаба,
- j) 28-32 мМ ацетата,
- k) 140-260 мМ сорбитола,
- l) 0,02-0,06% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

В одном воплощении фармацевтические композиции составляют, как описано здесь, напр., в 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, рН 5,5, и 0,04% мас./об. полисорбата 80, и их можно разводить перед введением с помощью разбавителя, получая требуемые концентрации биспецифичного антитела. Например, антитела можно разводить до концентрации от 2 мкг/мл до 24 мг/мл биспецифичного антитела. К примеру, лекарственный препарат, составленный в 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, рН 5,5, и 0,04% мас./об. полисорбата 80, может содержать биспецифичное антитело, например, эпкоритамаба, как определено здесь, в концентрации от 2 до 8 мг/мл, которое можно развести до концентрации от 100 мкг/мл до 2 мг/мл с помощью соответствующего разбавителя перед введением. В одном воплощении состав разбавителя: 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, рН 5,5, и 0,04% мас./об. полисорбата 80. В другом воплощении состав разбавителя: 30 мМ ацетата, 250 мМ сорбитола, рН 5,5, и 0,04% мас./об. полисорбата 80. В другом воплощении разбавителем является фармацевтически приемлемый разбавитель. В другом воплощении фармацевтически приемлемым разбавителем является 0,9% раствор хлорида натрия в воде. Предпочтительно разведение антитела до выбранной концентрации, что позволяет вводить подходящий объем пациентам, напр., для подкожного введения, проводится за несколько дней до введения. В одном воплощении разведение готовится за день до введения. В другом воплощении разведение препарата антитела готовится в самый день введения.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную

последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную

последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ

буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное

вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека,

содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 mM ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 mM полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 mM ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 mM полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 mM ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 mM сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 mM буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 mM полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 mM буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 mM сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 mM буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 mM сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 mM ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 mM сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь

согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее

CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции,

включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 5 до 60 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3,

включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ

ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В

некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, VL-CDR2, включающий GTN, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, VH-CDR2, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9, VH-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10, VL-CDR1, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, VL-CDR2, включающий DAS, и VL-CDR3, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:

14, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен

связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,0 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего (1) домен связывания CD3 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и (2) домен связывания CD20 человека, содержащий VH, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и VL, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В

некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего

связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл биспецифичного антитела, включающего связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с pH от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет pH от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл эпоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с pH от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл элкоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл элкоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ полиола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл элкоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) поверхностно-активное вещество (ПАВ). В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл элкоритамаба, (ii) 20-40 мМ буфера с рН от 5,3 до 6,5, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об. В некоторых воплощениях буфер имеет рН от 5,3 до 5,6.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие: (i) от 0,5 до 120 мг/мл элкоритамаба, (ii) 20-40 мМ ацетатного буфера с рН от 5,3 до 5,6, (iii) от 140 до 250 мМ сорбитола и (iv) полисорбат 80. В некоторых воплощениях ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об.

Композиции предпочтительно стабильны для фармацевтического применения не менее 6 месяцев, например, не менее 9 месяцев или не менее 12 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C. В одном воплощении фармацевтические композиции стабильны для фармацевтического применения в течение 12 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C. В одном воплощении фармацевтические композиции стабильны для фармацевтического применения в течение 18 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C. В одном воплощении фармацевтические композиции стабильны для фармацевтического применения в течение 24 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C. В одном воплощении фармацевтические композиции стабильны для фармацевтического применения в течение 30 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C. В одном воплощении фармацевтические композиции

стабильны для фармацевтического применения в течение 36 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C.

В другом воплощении фармацевтические композиции не содержат гиалуронидазы.

В предпочтительном воплощении фармацевтические композиции не содержат значительного количества хлорида натрия. Имеется в виду, что композиции предпочтительно не должны содержать значительного количества хлорида натрия, добавленного в состав. Например, рН буфера, например, предпочтительного ацетатного буфера можно необязательно доводить с помощью растворов NaOH и/или HCl, при этом добавления растворов NaOH обычно достаточно для доведения рН. Фармацевтические композиции предпочтительно должны содержать менее 20 мМ хлорида натрия. Поэтому фармацевтические композиции, содержащие биспецифичное антитело, ацетатный буфер, сорбитол, ПАВ и такой рН, как описано здесь, также могут содержать небольшое количество хлорида натрия, т.е. менее 20 мМ, причем более предпочтительно в фармацевтические композиции не добавляется хлорид натрия.

В другом воплощении фармацевтические композиции могут дополнительно содержать аргинин. Так, фармацевтические композиции, содержащие биспецифичное антитело, ацетатный буфер, сорбитол, ПАВ и такой рН, как описано здесь, могут также содержать небольшое количество аргинина, т.е. менее 60 мМ.

Итак, аргинин может содержаться, к примеру, в композиции вплоть до 60 мМ. Например, аргинин может содержаться в концентрации 20 мМ.

В предпочтительном воплощении фармацевтические композиции представляют собой композиции для подкожного введения или же фармацевтические композиции для применения при подкожном введении. Однако фармацевтические композиции по изобретению также можно вводить внутривенно. Соответственно, в одном воплощении фармацевтические композиции представляют собой композиции для внутривенного введения или же фармацевтические композиции для применения при внутривенном введении. Преимуществом настоящего изобретения является то, что фармацевтические композиции подходят как для подкожного, так и для внутривенного введения.

В одном воплощении изобретения фармацевтические композиции предназначены для применения при лечении рака. В другом воплощении изобретения фармацевтические композиции предназначены для применения при лечении В-клеточной онкологии.

В другом воплощении фармацевтические композиции по изобретению могут применяться для индуцирования Т-клеточных иммунных реакций, воспаления и ремоделирования микроокружения.

В одном конкретном воплощении фармацевтические композиции предназначены

для применения *in vivo* для лечения, профилактики или диагностики различных заболеваний, связанных с CD20. Примеры связанных с CD20 заболеваний включают, среди прочего, В-клеточную лимфому, напр., неходжкинскую лимфому (NHL), В-клеточную лейкемию и иммунные заболевания, напр., аутоиммунные заболевания, например, перечисленных ниже.

В одном воплощении фармацевтические композиции по изобретению предназначены для применения при лечении NHL или В-клеточной лейкемии.

В одном воплощении фармацевтические композиции по изобретению предназначены для применения при лечении устойчивой к антителам к CD20 NHL или В-клеточной лейкемии, например, устойчивой к ритуксимабу или офатумумабу NHL или В-клеточной лейкемии, напр., устойчивой к ритуксимабу неагрессивной В-клеточной лимфомы.

В одном воплощении фармацевтические композиции по изобретению предназначены для применения при лечении острой лимфобластной лейкемии (ALL), например, рецидивирующей или рефрактерной ALL.

В одном воплощении фармацевтические композиции по изобретению предназначены для применения при лечении CLL, например, рецидивирующей или рефрактерной CLL.

В одном воплощении фармацевтические композиции по изобретению предназначены для применения при лечении FL, например, рецидивирующей или рефрактерной FL.

Изобретением также предусмотрен способ лечения рака у субъектов, включающий введение нуждающимся в этом субъектам фармацевтических композиций, как описано выше, в течение времени, достаточного для лечения рака.

Изобретением также предусмотрен способ лечения рака у субъектов, включающий введение нуждающимся в этом субъектам фармацевтических композиций, как описано выше, подкожно в течение времени, достаточного для лечения рака.

Изобретением также предусмотрен способ лечения рака у субъектов, включающий введение нуждающимся в этом субъектам фармацевтических композиций, как описано выше, внутривенно в течение времени, достаточного для лечения рака. В одном воплощении изобретения рак, подлежащий лечению данным способом, представляет собой В-клеточное злокачественное образование, например, NHL, CLL, ALL, FL или устойчивой к антителам против CD20 NHL или В-клеточной лейкемии, например, устойчивой к ритуксимабу или офатумумабу NHL или В-клеточной лейкемии, напр., устойчивой к ритуксимабу неагрессивной В-клеточной лимфомы.

В одном воплощении фармацевтические композиции по изобретению находятся в единичных дозовых формах. В одном воплощении единичная доза по изобретению представляет собой жидкую единичную дозу.

В одном воплощении изобретения единичная дозовая форма включает:

а) биспецифичное антитело, содержащее первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12,

в количестве от 5 мкг до 50 мг,

б) ацетатный буфер, сорбитол и поверхностно-активное вещество (ПАВ), причем рН составляет 5,5.

В одном воплощении единичных дозовых форм ацетатный буфер и сорбит содержатся при соотношении концентраций от 1:5 до 1:10, например, при соотношении концентраций 1:6, 1:7, 1:8 или 1:9.

В другом воплощении осмоляльность единичных дозовых форм составляет от 210 до 250, например, 220, 230, 240 или 250 мОсм/кг. В следующем воплощении осмоляльность единичных дозовых форм составляет от 200 до 600, более предпочтительно от 220 до 380. Так, осмоляльность может составлять от 220 до 600 или от 220 до 380 мМ, например, 220 или 230 или 240 или 250 или 260 или 270 или 280 или 290 или 300 или 310 или 320 или 330 или 340 или 350 или 360 или 370 или 380 мОсм/кг.

В другом воплощении изобретения предусмотрены единичные дозовые формы, включающие:

а) биспецифичное антитело, содержащее первую область связывания,

связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12,

в количестве от 5 мкг до 50 мг,

b) ацетатный буфер в концентрации 30 мМ,

c) сорбитол в концентрации 150 мМ при pH 5,5 и

d) 0,04% масс. полисорбата 80.

Составы единичных дозовых форм могут быть такими же, как и фармацевтических композиций, описанных здесь.

В одном воплощении вышеописанных единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет от 40 мкг до 40 мг, например, от 50 мкг до 40 мг.

В одном воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет от 40 мкг до 30 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 150 мкг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 200 мкг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 250 мкг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 300 мкг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 350 мкг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 400 мкг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 450 мкг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 500 мкг. В другом воплощении единичных дозовых





составляет 53 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 54 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 55 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 56 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 57 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 58 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 59 мг. В другом воплощении единичных дозовых форм количество биспецифичного антитела составляет 60 мг.

В одном воплощении единичных дозовых форм по изобретению первая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD3 человека, включает последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 6 и 7, а вторая связывающая область биспецифичного антитела, связывающаяся с CD20 человека, включает последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 13 и 14. В одном предпочтительном воплощении единичных дозовых форм по изобретению биспецифичное антитело представляет собой дуотело CD3xCD20, как описано выше. В одном предпочтительном воплощении единичных дозовых форм по изобретению биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно. В другом предпочтительном воплощении единичных дозовых форм по изобретению биспецифичное антитело представляет собой эпкоритамаб или его биоаналог.

В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет примерно от 0,3 мл до 3 мл, например, от 0,3 мл до 3 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 0,5 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 0,8 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 1 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 1,2 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 1,5 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 1,7 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 2 мл. В другом воплощении общий объем единичной дозовой формы по изобретению составляет 2,5 мл. Такие дозовые формы подходят для подкожного введения. В одном предпочтительном воплощении объем единичной дозовой формы для подкожного введения составляет 1 мл. В другом

предпочтительном воплощении объем единичной дозовой формы для подкожного введения составляет 0,8 мл.

В тех воплощениях, в которых единичные дозовые формы предназначены для внутривенного введения, объем обычно больше, например, от 10 мл до 500 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 20 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 50 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 80 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 100 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 150 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 150 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 200 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 250 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 300 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 350 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 400 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 450 мл. В одном воплощении объем единичной дозовой формы составляет 500 мл.

Единичные дозовые формы получают путем разведения фармацевтических композиций по изобретению подходящим разбавителем, таким, напр., как разбавитель, состоящий из ацетатного буфера и сорбитола при pH 5,5. Предпочтительны коммерчески доступные фармацевтически приемлемые разбавители. Предпочтительно разбавитель может содержать поверхностно-активное вещество, буфер и сорбитол в таких же концентрациях, что и фармацевтическая композиция с тем, чтобы при разведении изменялась только концентрация биспецифичного антитела. С другой стороны, как показано в разделе примеров, можно использовать разбавитель, например, 0,9% раствора хлорида натрия в воде для инъекций.

В другом воплощении изобретения дополнительно предусмотрены контейнеры или ёмкости, содержащие описанные здесь единичные дозовые формы.

Кроме того, изобретением предусмотрен способ лечения рака у субъектов, включающий введение нуждающимся в этом субъектам единичной дозовой формы, как описано здесь, в течение времени, достаточного для лечения рака. В одном воплощении изобретения предусмотрен способ лечения рака у субъектов, включающий подкожное введение нуждающимся в этом субъектам единичной дозовой формы. В одном воплощении изобретения предусмотрен способ лечения рака у субъектов, включающий внутривенное введение нуждающимся в этом субъектам единичной дозовой формы.

В другом воплощении изобретения предусмотрены описанные выше единичные

дозовые формы для применения при лечении рака. В другом воплощении единичные дозовые формы предназначены для подкожного введения. В другом воплощении единичные дозовые формы предназначены для внутривенного введения.

Настоящим изобретением также предусмотрены наборы, включающие:

- a) фармацевтическую композицию, описанную здесь,
- b) разбавитель, содержащий ацетат, сорбитол и полисорбат 80,
- c) ёмкость для единичной дозовой формы,
- d) инструкции по разведению и/или по применению.

Предпочтительно, чтобы соотношение концентраций ацетата и сорбитола было одинаковым в разбавителе и фармацевтической композиции.

В одном воплощении изобретения наборы включают:

- a) фармацевтическую композицию, содержащую:
  - i. 5-60 мг/мл биспецифичного антитела, например, дуотело CD3xCD20,
  - ii. 30 мМ ацетатного буфера,
  - iii. 150 мМ сорбитола,
  - iv. 0,04% мас./об. полисорбата 80,
  - v. pH равно 5,5;
- b) разбавитель, включающий:
  - i. 30 мМ ацетатного буфера,
  - ii. 150 мМ сорбитола,
  - iii. 0,04% мас./об. полисорбата 80;
- c) ёмкость для единичной дозовой формы;
- d) инструкции по разведению и/или по применению.

В одном воплощении изобретения наборы включают:

- a) фармацевтическую композицию, содержащую:
  - i. 5-60 мг/мл биспецифичного антитела, например, эпкоритамаба или его биоаналога,
  - ii. 30 мМ ацетатного буфера,
  - iii. 150 мМ сорбитола,
  - iv. 0,04% мас./об. полисорбата 80,
  - v. pH равно 5,5;
- c) ёмкость для единичной дозовой формы;
- d) инструкции по разведению и/или по применению.

В одном воплощении изобретения наборы включают:

- a) фармацевтическую композицию, содержащую:

i. 5-60 мг/мл биспецифичного антитела, например, эпкоритамаба или его биоаналога,

ii. 30 мМ ацетатного буфера,

iii. 250 мМ сорбитола,

iv. 0,04% мас./об. полисорбата 80,

v. pH равно 5,5;

b) разбавитель, включающий:

i. 30 мМ ацетатного буфера,

ii. 150 мМ сорбитола,

iii. 0,04% мас./об. полисорбата 80;

c) ёмкость для единичной дозовой формы;

d) инструкции по разведению и/или по применению.

В одном воплощении изобретения также предусмотрен способ получения фармацевтических композиций, как описано здесь, который включает стадии смешивания с водой для инъекций:

a) 5-120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5;

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12;

b) 3,53 мг/мл ацетата натрия тригидрата,

c) 0,24 мг/мл уксусной кислоты или 0,32 мг/мл 75% раствора уксусной кислоты,

d) 27,3 мг/мл сорбитола,

e) 0,4 мг/мл полисорбата 80;

и доведение до pH 5,5 добавлением гидроксида натрия.

В одном воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 5 мг/мл. В одном воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 10 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 12 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 15 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 20 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 24 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 30 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 40 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 48 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 50 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 60 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 120 мг/мл. В другом воплощении способа получения фармацевтических композиций по изобретению [a] составляет 200 мг/мл.

Изобретением также предусмотрен способ получения единичных дозовых форм, как описано здесь, который включает стадии:

а) получение фармацевтической композиции методом смешивания с водой для инъекций:

- i. 5-120 мг/мл биспецифичного антитела, как-то, напр., 12 мг или 24 мг, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 1, VH-CDR2: SEQ ID NO: 2, VH-CDR3: SEQ ID NO: 3, VL-CDR1: SEQ ID NO: 4, VL-CDR2: GTN и VL-CDR3: SEQ ID NO: 5; и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO: 8, VH-CDR2: SEQ ID NO: 9, VH-CDR3: SEQ ID NO: 10, VL-CDR1: SEQ ID NO: 11, VL-CDR2: DAS и VL-CDR3: SEQ ID NO: 12;
- ii. 3,53 мг/мл ацетата натрия тригидрата,
- iii. 0,32 мг/мл 75% раствора уксусной кислоты,
- iv. 27,3 мг/мл сорбитола,
- v. 0,04% масс./об. полисорбата 80,
- vi. и доведение до pH 5,5 добавлением гидроксида натрия;

- b) приготовление разбавителя в воде для инъекций, включающего:
  - i. 3,53 мг/мл ацетата натрия тригидрата,
  - ii. 0,32 мг/мл 75% раствора уксусной кислоты,
  - iii. 27,3 мг/мл сорбитола,
  - iv. 0,04% масс./об. полисорбата 80,
  - v. и доведение до pH 5,5 добавлением гидроксида натрия;

c) смешивание фармацевтической композиции и разбавителя до требуемой концентрации биспецифичного антитела в единичной дозовой форме.

В другом воплощении изобретения предусмотрены фармацевтические композиции или единичные дозовые формы, получаемые описанными выше способами.

### **Воплощения**

1. Фармацевтическая композиция, содержащая или состоящая в основном из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела, связывающегося с CD3 человека и с CD20 человека,
- b) 20-40 mM ацетата,
- c) 140-160 mM сорбитола,
- d) поверхностно-активного вещества,

причем значение pH композиции составляет от 5 до 6, а биспецифичное антитело содержит первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12.

2. Фармацевтическая композиция по воплощению 1, при этом первая область

связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD3, содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , которые по последовательности по меньшей мере на 90% идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7.

3. Фармацевтическая композиция по воплощению 1 или 2, при этом вторая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD20, содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , которые по последовательности по меньшей мере на 90% идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14.

4. Фармацевтическая композиция по любому из воплощений 1-3, при этом биспецифичное антитело представляет собой антитело IgG1.

5. Фармацевтическая композиция по любому из воплощений 1-4, при этом биспецифичное антитело содержит первую и вторую легкую цепь, которые включают первую и вторую константные области легкой цепи, выбранные из константной области легкой цепи лямбда и константной области легкой цепи каппа, например, константных областей легкой цепи согласно SEQ ID NO: 22 и 23.

6. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом биспецифичное антитело содержит Fc-область, включающую первую и вторую тяжелую цепь, причем данная Fc-область была модифицирована так, чтобы её эффекторные функции были снижены по сравнению с биспецифичным антителом, содержащим Fc-область IgG1 дикого типа.

7. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом биспецифичное антитело содержит Fc-область, которая была модифицирована так, чтобы связывание C1q с данным антителом снижалось по сравнению с биспецифичным антителом, содержащим Fc-область IgG1 дикого типа, по меньшей мере на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 97% или на 100% при определении связывания C1q методом ELISA.

8. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом биспецифичное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, каждая из которых включает как минимум шарнирную область и области CH2 и CH3, причем в данной первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, а в данной второй

тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, причем замены в данной первой и данной второй тяжелых цепях находятся не в одинаковых положениях.

9. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом (i) в первой тяжелой цепи биспецифичного антитела аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена L, а во второй тяжелой цепи биспецифичного антитела аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена R, либо (ii) в первой тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена R, а во второй тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена L.

10. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, находятся F и E, соответственно.

11. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, находятся F, E и A, соответственно.

12. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом в константной области первой тяжелой цепи и в константной области второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, находятся F, E и A, соответственно, при этом в константной области первой тяжелой цепи в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, находится L, а в константной области второй тяжелой цепи в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, находится R.

13. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом константные области первой и второй тяжелой цепи включают аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:16.

14. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом константные области первой и второй тяжелой цепи включают аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 19 и 20, соответственно.

15. Фармацевтическая композиция по любому из воплощений 1-13, при этом

биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

16. Фармацевтическая композиция по любому из воплощений 1-13, при этом биспецифичное антитело представляет собой эпкоритамаб или его биоаналог.

17. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом [a] составляет 0,5-120 мг/мл, например, 1,0-60 мг/мл или 5-30 мг/мл, например, 5 мг/мл или 6 мг/мл или 7 мг/мл или 8 мг/мл или 9 мг/мл или 10 мг/мл или 11 мг/мл или 12 мг/мл или 13 мг/мл или 14 мг/мл или 15 мг/мл или 16 мг/мл или 17 мг/мл или 18 мг/мл или 19 мг/мл или 20 мг/мл или 21 мг/мл или 22 мг/мл или 23 мг/мл или 24 мг/мл или 25 мг/мл или 26 мг/мл или 27 мг/мл или 28 мг/мл или 29 мг/мл или же 30 мг/мл.

18. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом [b] составляет 25-35 мМ, например, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ, 30 мМ, 31 мМ, 32 мМ, 33 мМ, 34 мМ или 35 мМ, предпочтительно 30 мМ.

19. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом [c] составляет 145-155 мМ, например, 145 мМ, 146 мМ, 147 мМ, 148 мМ, 149 мМ, 150 мМ, 151 мМ, 152 мМ, 153 мМ, 154 мМ, 155 мМ, предпочтительно 150 мМ.

20. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом рН составляет 5,3-5,6 или 5,4-5,6, например, 5,5.

21. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом поверхностно-активное вещество выбрано из группы, включающей глицеринмоноолеат, бензетоний хлорид, докузат натрия, фосфолипиды, полиэтиленалкиловые эфиры, лаурилсульфат натрия и трикаприлин, бензалконий хлорид, цетримид, цетилпиридиний хлорид, фосфолипиды,  $\alpha$ -токоферол, глицеринмоноолеат, миристиловый спирт, фосфолипиды, полочсамеры, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, полиоксиэтиленовые производные касторового масла, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, полиоксиэтиленстеараты, полиоксил-гидроксистеарат, полиоксилглицериды, полисорбаты, пропиленгликольдилаурат, пропиленгликольмонолаурат, сложные сорбитановые эфиры сахарозы и пальмитата, сахарозы и стеарата, трикаприлин и TPGS.

22. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом поверхностно-активным веществом (ПАВ) является полисорбат.

23. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом поверхностно-активным веществом (ПАВ) является полисорбат 20 или 80, например, полисорбат 80.

24. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об., например, от 0,01 до 0,1% или от 0,01 до 0,09% или от 0,01 до 0,06% или от 0,01 до 0,05% мас./об., например, 0,02% или 0,03% или 0,04% или 0,05% мас./об., предпочтительно 0,04% мас./об.

25. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция имеет рН 5,4-5,6, например, 5,5 и содержит или в основном состоит из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 20-40 мМ ацетата,
- c) 140-160 мМ сорбитола,
- d) 0,005-0,4% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

26. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция имеет 5,4-5,6, например, 5,5 и содержит или в основном состоит из:

- a) 5-60 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,05% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

27. Фармацевтическая композиция по воплощению 25 или 26, при этом [a] составляет 10-50 мг/мл.

28. Фармацевтическая композиция по воплощению 25 или 26, при этом [a] составляет 12-24 мг/мл, например, 12 мг/мл или 24 мг/мл.

29. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция имеет рН 5,5 и содержит или в основном состоит из:

- a) 5-60 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 30 мМ ацетата,
- c) 150 мМ сорбитола,
- d) 0,04% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

30. Фармацевтическая композиция по воплощению 29, при этом [a] составляет 10-50 мг/мл.

31. Фармацевтическая композиция по воплощению 29 или 30, при этом [a] составляет 12-24 мг/мл, например, 12 мг/мл или 24 мг/мл.

32. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция не содержит гиалуронидазы.

33. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция представляет собой подкожную композицию.

34. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция представляет собой внутривенную композицию.

35. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция предназначена для применения при лечении рака.

36. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция предназначена для применения при подкожном введении.

37. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция предназначена для применения при внутривенном введении.

38. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений 1-37, которая находится в единичной дозовой форме.

39. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных воплощений, при этом композиция стабильна для фармацевтического применения в течение по меньшей мере 6 месяцев, например, не менее 9 месяцев или 12 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C.

40. Применение фармацевтической композиции по любому из воплощений 1-33 для подкожного введения.

41. Применение фармацевтической композиции по любому из воплощений 1-32 для внутривенного введения.

42. Применение по воплощению 40 или 41, при этом применение предназначено для лечения рака.

43. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из воплощений 1-39 в течение времени, достаточного для лечения рака.

44. Способ по воплощению 43, при этом композиция вводится подкожно или внутривенно.

45. Способ по воплощению 43 или 44, при этом рак представляет собой В-клеточное злокачественное образование .

46. Единичная дозовая форма, содержащая или состоящая в основном из:

а) биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12

в количестве от 5 мкг до 50 мг,

b) ацетатного буфера и сорбитола в соотношении от 1:5 до 1:10, при этом осмоляльность единичной дозовой формы составляет от 210 до 250 мМ, а pH – от 5,4 до 5,6, и

c) поверхностно-активного вещества.

47. Единичная дозовая форма по воплощению 46, содержащая или состоящая в основном из:

a) биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12

в количестве от 5 мкг до 50 мг,

b) ацетата в концентрации 30 мМ при pH 5,5,

c) сорбитола в концентрации 150 мМ и

d) 0,04% мас./об. полисорбата 80.

48. Единичная дозовая форма по воплощению 46 или 47, при этом первая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD3 человека, включает последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, а вторая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD20 человека, включает последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14.

49. Единичная дозовая форма по воплощению 48, при этом биспецифичное антитело содержит константные области первой и второй тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 и 20, соответственно.

50. Единичная дозовая форма по воплощению 48, при этом биспецифичное антитело содержит связывающее CD3 плечо, включающее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, включающее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

51. Единичная дозовая форма по воплощению 48, при этом биспецифичное антитело представляет собой эпкоритамаб или его биоаналог.

52. Единичная дозовая форма по любому из воплощений 46-51, при этом количество биспецифичного антитела составляет от 40 мкг до 40 мг.

53. Единичная дозовая форма по любому из воплощений 46-52, при этом количество биспецифичного антитела составляет от 40 мкг до 30 мг, например, 40 мкг, 50 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 350 мкг, 400 мкг, 450 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг, 16 мг, 17 мг, 18 мг, 19 мг, 20 мг, 21 мг, 22 мг, 23 мг, 24 мг, 25 мг, 26 мг, 27 мг, 28 мг, 29 мг или 30 мг.

54. Единичная дозовая форма по любому из воплощений 46-53, при этом общий объем составляет от 0,5 мл до 2 мл, например, 1 мл.

55. Единичная дозовая форма по воплощению 54, которая предназначена для подкожного введения.

56. Единичная дозовая форма по любому из воплощений 46-53, при этом общий объем составляет от 20 мл до 200 мл, а дозовая форма предназначена для внутривенного введения.

57. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом

субъекту единичной дозовой формы по любому из воплощений 46-56 в течение времени, достаточного для лечения рака.

58. Единичная дозовая форма по любому из воплощений 46-56 для применения при лечении рака.

59. Контейнер, содержащий единичную дозовую форму по любому из воплощений 46-56.

60. Набор, включающий:

- a) фармацевтическую композицию по любому из воплощений 1-32,
- b) разбавитель, содержащий ацетат, сорбитол и полисорбат 80,
- c) ёмкость для единичной дозовой формы,
- d) инструкции по разведению и/или по применению.

61. Набор, включающий:

- a) фармацевтическую композицию по любому из воплощений 1-32,
- b) ёмкость для единичной дозовой формы,
- c) инструкции по разведению и/или по применению.

62. Набор по воплощению 60, при этом соотношение концентраций ацетата, сорбитола и полисорбата 80 одинаково в разбавителе и фармацевтической композиции.

63. Набор по любому из воплощений 60-62, включающий:

- a) фармацевтическую композицию, содержащую:
  - i. 5-60 мг/мл биспецифичного антитела, например, эпкоритамаба или его биоаналога,
  - ii. 30 мМ ацетатного буфера,
  - iii. 150 мМ сорбитола,
  - iv. 0,04% мас./об. полисорбата 80,
  - v. pH равно 5,5;
- b) разбавитель, если содержится в наборе, включающий:
  - i. 30 мМ ацетатного буфера,
  - ii. 150 мМ сорбитола,
  - iii. 0,04% мас./об. полисорбата 80;
- c) ёмкость для единичной дозовой формы;
- d) инструкции по разведению и/или по применению.

64. Способ получения фармацевтической композиции по любому из воплощений 1-32, включающий стадии смешивания с водой для инъекций:

a) 5-120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12,

b) 3,53 мг/мл ацетата натрия тригидрата,

c) 0,24 мг/мл уксусной кислоты,

d) 27,3 мг/мл сорбитола,

e) 0,4 мг/мл полисорбата 80,

и доведение до pH 5,5 добавлением гидроксида натрия.

65. Способ по воплощению 64, при этом [a] составляет 12 мг/мл.

66. Способ по воплощению 64, при этом [a] составляет 24 мг/мл.

67. Способ получения единичной дозовой формы по любому из воплощений 46-56, включающий стадии:

a) получение фармацевтической композиции способом по любому из воплощений 64-66,

b) приготовление разбавителя в воде для инъекций, включающего:

i. 3,53 мг/мл ацетата натрия тригидрата,

ii. 0,32 мг/мл 75% раствора уксусной кислоты,

iii. 27,3 мг/мл сорбитола,

iv. 0,4 мг/мл полисорбата 80,

v. гидроксид натрия для доведения до pH 5,5,

c) смешивание фармацевтической композиции и разбавителя до требуемой концентрации биспецифичного антитела.

68. Фармацевтическая композиция или единичная дозовая форма, которая получена способом по любому из воплощений 64-67.

Таблица 1. Последовательности

SEQ ID NO:	Название клона	Последовательность
SEQ ID NO:1	CDR1 VH huCD3	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	CDR2 VH huCD3	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	CDR3 VH huCD3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:4	CDR1 VL huCD3	TGAVTTSNY
	CDR2 VL huCD3	GTN
SEQ ID NO:5	CDR3 VL huCD3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:6	VH1 huCD3	<u>EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA</u> MNWVRQAPGKГLEWVAR <u>IRSKYNNYATYYAD</u> SVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYY <u>CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS</u>
SEQ ID NO:7	VL1 huCD3	<u>QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY</u> ANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LIGDKAALTITGAQADDESIYFC <u>ALWYSNLWV</u> GGGKTLTVL
SEQ ID NO:8	CDR1 VH CD20-7D8	GFTFHDTYA
SEQ ID NO:9	CDR2 VH CD20-7D8	ISWNSGTI
SEQ ID NO:10	CDR3 VH CD20-7D8	AKDIQYGNYYYGMDV
SEQ ID NO:11	CDR1 VL CD20-7D8	QSVSSY
	CDR2 VL CD20-7D8	DAS
SEQ ID NO:12	CDR3 VL CD20-7D8	QQRSNWPIT
SEQ ID NO:13	VH CD20-7D8	<u>EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDTYA</u> MHWVRQAPGKГLEWVSTISWNSGTIGYADSVK ГRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCA <u>K</u> <u>DIQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSS</u>
SEQ ID NO:14	VL CD20-7D8	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQRSNWPITFGQ</u> TRLEIK
SEQ ID NO:15	IgG1 – WT константная область тяжелой цепи (аминокислоты в положениях 118- 447 по нумерации EU), <u>подчеркнут</u> <u>участок CH3</u>	ASTKГPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKГ <u>QPREPQVYTL</u> <u>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
SEQ ID NO:16	IgG1-LFLEDA константная область тяжелой цепи (аминокислоты в	ASTKГPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRVEPKS CDKTHTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVA <u>V</u> SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

	положениях 118-447 по нумерации EU)	AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:17	IgG1-F405L  (аминокислоты в положениях 118-447 по нумерации EU)	ASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:18	IgG1-K409R  (аминокислоты в положениях 118-447 по нумерации EU)	ASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:19	IgG1-LFLEDA-F405L (FEAL)  (аминокислоты в положениях 118-447 по нумерации EU)	ASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFE <del>LL</del> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVA <del>V</del> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:20	IgG1-LFLEDA-K409R (FEAR)  (аминокислоты в положениях 118-447 по нумерации EU)	ASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFE <del>LL</del> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVA <del>V</del> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:21	участок CH3 IgG1	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:22	константная область LC лямбда человека	GQPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV

		APTECS
SEQ ID NO:23	константная область LC каппа человека	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
SEQ ID NO:24	легкая цепь VL+CL huCD3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQTTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LIGDKAALITGAQADDESIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:25	легкая цепь VL+CL CD20-7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQG TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:26	тяжелая цепь huCD3-LFLEDA-F405L (FEAL)	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLVWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNILKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDK THTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVA <u>V</u> SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAPIEKISKAKTQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSF <u>LL</u> YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:27	тяжелая цепь CD20-7D8-LFLEDA-K409R (FEAR)	EVQLVESGGGLVQPDRLRLSCAASGFTFHDIYA MHWVRQAPGKGLVWVSTISWNSGTIGYADSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK <u>DIQYGNYYYGMDVWGQGT</u> TVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHC PPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVA <u>V</u> SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKISKAKTQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSF <u>FLYSRL</u> TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

## ПРИМЕРЫ

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть получены путем смешивания ингредиентов, перечисленных в табл. 2.

**Таблица 2.** Состав фармацевтических композиций с дуотелом CD3xCD20 по изобретению

Ингредиенты	Количество на 1 мл	Функция	Ссылка
<b>Активный ингредиент</b>		активный	
дуотело CD3xCD20	5,0 мг	ингредиент	
<b>Неактивные ингредиенты</b>			
Ацетат натрия тригидрат	3,53 мг	буферный агент	USP/Ph.Eur.
Уксусная кислота <sup>#</sup>	0,32 мг	буферный агент	NF/Ph.Eur.
Гидроксид натрия	q.s.	доведение pH	Ph.Eur.
Сорбитол	27,3 мг	изотоничность	NF/Ph.Eur.
Полисорбат 80	0,4 мг	ПАВ	NF/Ph.Eur.
Вода для инъекций	q.s. до 1,00 мл	растворитель	USP/Ph.Eur.

<sup>#</sup> 75% раствор уксусной кислоты

USP- фармакопея США

Ph.Eur. – Европейская фармакопея

NF- Национальный формуляр (*прим.* к фармакопее США)

### **Пример 1. Стабильность дуотело CD3xCD20 в различных составах**

#### Сокращения

Сокращение/термин	Определение
A <sub>280</sub>	поглощение при 280 нм
A <sub>550</sub>	поглощение при 550 нм
BCM	барицентрическое среднее
CE	капиллярный электрофорез
DSF	дифференциальная сканирующая флуориметрия
DLS	динамическое рассеяние света
HC	тяжелая цепь
HMW	высокомолекулярный
HPLC	высокоэффективная жидкостная хроматография
icIEF	капиллярное изоэлектрофокусирование с визуализацией
LC	легкая цепь
LMW	низкомолекулярный
NaCl	хлорид натрия
NGHC	негликозилированная тяжелая цепь
RH	относительная влажность
Ppm	части на миллион (миллионные доли)
% Pd	степень полидисперсности в %
SDS	додецилсульфат натрия
SEC	эксклюзионная хроматография
SLS	статическое рассеяние света
T <sub>agg</sub>	температура начала агрегации
T <sub>onset</sub>	температура начала разворачивания
T <sub>m</sub>	температура плавления (= средняя точка разворачивания)
UV	ультрафиолет

Материал

Готовили дуотело CD3xCD20 в концентрации 2 мг/мл, если не указано иначе.

## **Методы**

### Термостойкость по флуоресценции/статическому светорассеянию

Определяли конформационную и коллоидную стабильность комбинированным методом измерения флуоресценции/статического светорассеяния (SLS) на приборе UNit (Unchained Labs). При измерении используется возрастающее термическое воздействие, вызывающее разворачивание и агрегацию белка для оценки конформационной и коллоидной стабильности. Переходы в развернутое состояние, вызванные возрастанием термического воздействия, выявляются по изменениям собственной флуоресценции остатков Trp (и Tyr) белка вследствие изменений локального окружения при разворачивании белка. По мере выхода спрятанных остатков триптофана максимальная длина волны излучения смещается в сторону более длинных волн. На графике зависимости барицентрической средней (BCM) длины волны, при которой спектр флуоресцентного излучения делится поровну, от температуры проявляется изменение конформации белка. При анализе флуоресценции по кривым BCM получают значения температуры начала разворачивания ( $T_{\text{onset}}$ ) и температуры плавления ( $T_m$ ).  $T_{\text{onset}}$  – расчетная температура, при которой белок начинает разворачиваться. А  $T_m$  – средняя точка перехода белка из свернутого состояния в развернутое состояние.

На приборе UNit также проводились измерения SLS для определения коллоидной стабильности белка. Образец освещается лазерным светом, который рассеивается молекулами в растворе. Интенсивность статического рассеяния света пропорциональна средней молекулярной массе частиц в растворе. Таким образом, этот метод чувствителен к агрегации белков при изменении температуры. Статическое светорассеяние измеряли при 266 нм для обнаружения мелких агрегатов, а также при 473 нм для обнаружения более крупных агрегатов. По этим данным определяли температуру начала агрегации ( $T_{\text{agg}}$ ), то есть температуру, при которой начинается агрегация белка. Эти данные лучше всего анализировать по большим изменениям значений интенсивности – чем больше эти значения, тем больше света рассеялось при образовании белковых агрегатов. При возрастании температуры изменения значений SLS в пределах 103 обычно означают значительную агрегацию белка, минимальные изменения значений SLS означают частичную агрегацию, а отсутствие изменения значений SLS при возрастании температуры свидетельствует о незначительной агрегации белка.

### Внешний вид

Внешний вид определяли визуально.

### pH

Значения pH измеряли на pH-метре Mettler Toledo SevenMulti.

#### Вязкость

Вязкость измеряли с помощью конусно-пластинчатого реометра Wells-Brookfield.

#### Осмоляльность

Осмоляльность измеряли с помощью осмометра.

#### Концентрация белка по значениям $A_{280}$

Концентрацию белка определяли методом УФ/видимой спектроскопии (измерение поглощения при 280 нм ( $A_{280}$ ) на УФ/видимом спектрофотометре Agilent (модель 8453).

#### Эксклюзионная хроматография (SEC)

Эксклюзионную хроматографию проводили на установке для HPLC Agilent 1100 или 1200, используя колонки TOSOH, TSK-gel G3000SWxL (7,8×300 мм) (Sigma, кат. № 08541).

#### Капиллярное изоэлектрофокусирование с визуализацией (icIEF)

Капиллярное изоэлектрофокусирование с визуализацией проводили на приборе iCE 3 Analyzer, снабженном автодозатором PrinCE.

#### Восстановительный и невосстановительный капиллярный электрофорез на микрочипах с додецилсульфатом натрия

Капиллярный электрофорез на микрочипах (и восстановительный, и невосстановительный) проводили на приборе Labchip GXII согласно инструкциям производителя.

#### Динамическое светорассеяние (DLS)

Анализ динамического светорассеяния проводили на считывающем устройстве Wyatt DynaPro. Методом DLS определяется размер белка и его агрегация при комнатной температуре. При DLS-анализе определяются временные автокорреляционные функции рассеяния света и рассчитывается средний размер молекул в растворе на основе кумулянтной аппроксимации данных по одной экспоненте. Отчетными данными являются полидисперсность и гидродинамический радиус. Для образцов белка, состоящих из одного распределения мономеров, образцы считаются монодисперсными; а для образцов, содержащих популяции частиц различного размера, образцы считаются полидисперсными. Индекс полидисперсности в процентах (%Pd) является мерой ширины распределения частиц по размерам: чем больше %Pd, тем шире распределение частиц. Поэтому образцы с высоким %Pd обычно содержат (крупные) агрегаты. Гидродинамический радиус несферических белковых частиц – это радиус сферы, имеющей такую же скорость поступательной диффузии, что и частицы. Скорость диффузии зависит от молекулярной массы частиц, структуры поверхности, а также

концентрации и, например, ионов в составе. Увеличение гидродинамического радиуса при монодисперсном распределении размеров может объясняться присутствием в растворе олигомеров более высокого порядка (напр., тетрамеров), но не крупных агрегатов.

#### Скрининг по растворимости

Для определения растворимости дуотела CD3xCD20 материал сначала помещали в выбранные буферы с низкой начальной концентрацией с помощью центрифужных концентраторов. После этого раствор концентрировали центрифугированием в течение 20, 50, 60 и 90 минут до целевой концентрации >120 мг/мл. После каждого центрифугирования измеряли концентрацию белка.

#### **Результаты**

##### Исходный биофизический скрининг и скрининг вспомогательных веществ

Проводили исходный биофизический скрининг для выбора комбинаций буфер/рН/наполнители для перехода к более подробному скринингу. Исходный биофизический скрининг и скрининг вспомогательных веществ включал скрининг по термостойкости дуотела CD3xCD20 (2 мг/мл) в широком диапазоне комбинаций буфер/рН/наполнители по флуоресценции/SLS и DLS. Список буферов и их значений рН, используемых для начального скрининга, приведен в табл. 3.

В табл. 3 представлены данные, полученные при исходном скрининге буферов, при котором тестировали буферы с 30 мМ ацетата и 30 мМ гистидина с эксципиентами или без них (150 мМ NaCl, 150 мМ аргинина, 150 мМ сорбитола или 150 мМ сахарозы). Измерения флуоресценции/SLS использовали для оценки термостойкости, а DLS – для определения агрегации дуотело CD3xCD20 (2 мг/мл) при комнатной температуре. При анализе флуоресценции/SLS получали значения температур плавления ( $T_m$ ), начала разворачивания ( $T_{onset}$ ) и  $T_{agg}$ . При анализе DLS получали информацию о полидисперсности и гидродинамическом радиусе белка.

При анализе термостойкости значения  $T_{onset}$  и  $T_m$  были несколько выше у ацетатных препаратов (в пределах от 53-58°C до 60-62,5°C, соответственно) по сравнению с соответствующими гистидиновыми препаратами (в пределах от 53-55°C до 59-61°C, соответственно). Повышение значений  $T_{onset}$  и  $T_m$  указывает на большую термостойкость белка. Отличия по  $T_{onset}$  и  $T_m$  между различными вспомогательными веществами были слабыми, но они могут указывать на небольшое снижение стабильности в присутствии аргинина и небольшое повышение стабильности в случае сорбитола или сахарозы. Определение  $T_{agg}$  по SLS показало, что и для ацетатных, и для гистидиновых препаратов добавление NaCl или аргинина приводит к снижению значений  $T_{agg}$  (59-60°C) по

сравнению с препаратами с сорбитолом или сахарозой или без эксципиентов. В ацетатных препаратах с сорбитолом или сахарозой наблюдалась частичная агрегация при 66°C, тогда как в гистидиновом буфере с этими наполнителями не наблюдалось агрегации.

DLS при комнатной температуре показало отрицательное влияние сахарозы на агрегационное поведение молекул, о чем свидетельствует повышение среднего радиуса и мультимодальное распределение. Сорбитол, похоже, также вызывает небольшое повышение среднего радиуса и %Pd.

На основании данных, полученных при начальном скрининге, сделали вывод, что дуотело CD3xCD20 является стабильным и монодисперсным в ацетатном буфере pH 5,5, гистидиновом pH 6,0 и гистидиновом pH 6,5 без наполнителей. Сорбитол и сахароза слегка повышают термостойкость. NaCl и аргинин снижают термостойкость. Исходя из результатов DLS при начальном скрининге сахароза была исключена из списка эксципиента при дальнейшем скрининге по растворимости. Для дальнейших исследований по растворимости были выбраны ацетатные препараты с pH 5,5, гистидиновые с pH 6,0 и гистидиновые с pH 6,5 с наполнителями или без них (150 мМ NaCl, 150 мМ аргинин или 150 мМ сорбитола).

**Таблица 3.** Результаты исходного биофизического скрининга и скрининга наполнителей для дуотела CD3xCD20 (2 мг/мл) в указанных составах

Термосканирование

Состав (буфер, pH, наполнитель)	T <sub>onset</sub> (по флуоресценции)	T <sub>m</sub> (по флуоресценции)	T <sub>agg</sub> (по SLS при 266 нм)
Ацетат pH 5,0	57	61,0	нет агрегации
Ацетат pH 5,5	58	62,0	частичная агрегация (66)
Ацетат pH 5,5 + NaCl	57	61,5	60
Ацетат pH 5,5 + аргинин	53	60,0	60
Ацетат pH 5,5 + сорбитол	58	62,5	частичная агрегация (66)
Ацетат pH 5,5 + сахароза	58	62,5	частичная агрегация (66)
Гистидин pH 5,5	53	59,0	нет агрегации
Гистидин pH 6,0	55	60,0	нет агрегации
Гистидин pH 6,0 + NaCl	53	60,0	59
Гистидин pH 6,0 + аргинин	53	59,0	60
Гистидин pH 6,0 + сорбитол	53	61,0	нет агрегации
Гистидин pH 6,0 + сахароза	55	61,0	нет агрегации
Гистидин pH 6,5	55	61,0	нет агрегации

DLS

<b>Состав (буфер, рН, наполнитель)</b>	<b>Радиус (нм)</b>	<b>%Pd</b>
Ацетат рН 5,0	5,009	5,7
	5,007	5,1
Ацетат рН 5,5	5,167	8,7
	5,337	18,4
Ацетат рН 5,5 + NaCl	5,179	3,7
	5,158	2,4
Ацетат рН 5,5 + аргинин	5,327	9,6
	5,398	12
Ацетат рН 5,5 + сорбитол	7,927	мультимодальный
	7,787	мультимодальный
Ацетат рН 5,5 + сахароза	32,649	мультимодальный
	33,18	мультимодальный
Гистидин рН 5,5	5,032	4,2
	5,016	6,3
Гистидин рН 6,0	корреляция не получилась	
	5,19	7,9
Гистидин рН 6,0 + NaCl	5,219	6,6
	5,363	14,2
Гистидин рН 6,0 + аргинин	5,288	8,3
	5,503	14,7
Гистидин рН 6,0 + сорбитол	5,801	24,6
	6,228	23,7
Гистидин рН 6,0 + сахароза	30,305	мультимодальный
	36,799	мультимодальный
Гистидин рН 6,5	5,142	9,6
	5,263	21

Скрининг по растворимости

Вторая стадия исходного исследования по биофизическому скринингу включала скрининг по растворимости комбинаций рН/буфер, выбранных при начальном биофизическом скрининге в комбинации с наполнителями. Список буферов, используемых на второй стадии скрининга, приведен в табл. 4.

Для определения растворимости в присутствии наполнителей материал заключали в выбранные буферы, а затем концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с заданной продолжительностью центрифугирования. На фиг. 1 представлена концентрация каждого препарата после центрифугирования в течение 20, 50, 60 и 90 мин. Ацетатные препараты с сорбитолом и без него концентрировались до 150 мг/мл быстрее всех (50 мин). Гистидиновые препараты с сорбитолом и без него концентрировались быстро (50 мин), но до более низкой концентрации (120 мг/мл). Все другие препараты концентрировались до 120 мг/мл, хотя эта концентрация достигалась медленнее (60-90 мин) по сравнению с ацетатными препаратами.

Далее концентрированные образцы (при конечной концентрации в 120-150 мг/мл) анализировали по флуоресценции/SLS и DLS (табл. 4) и вязкости (фиг. 2).

Из табл. 4 видно, что препараты без наполнителей и с сорбитолом имели самые высокие  $T_m$ . Значения  $T_{agg}$  в препаратах без наполнителей и с сорбитолом было трудно интерпретировать, так как переходы были нечеткими по сравнению с измерениями в препаратах с NaCl и Arg.

Данные по DLS при комнатной температуре показывают общее увеличение %Pd при большей концентрации дуотела CD3xCD20 по сравнению с низкой концентрацией в табл. 3 (>15% считаются полидисперсными). На изменчивость среднего гидродинамического радиуса могла повлиять и вязкость концентрированного материала, что затрудняет правильное ранжирование препаратов.

На фиг. 2 представлена вязкость (сП) различных препаратов с сорбитолом и без него. Ацетатные препараты проявляли вязкость в пределах 7,9-12,1 сП. Напротив, препараты с гистидином без сорбитола были более вязкими, чем препараты с ацетатом (в пределах 28,4-79,9 сП). Добавление сорбитола снижало вязкость препаратов с гистидином (в пределах 18-30 сП), тогда как на вязкость препаратов с ацетатом сорбитол не влиял.

**Таблица 4.** Результаты по концентрированным образцам (120-150 мг/мл дуотело CD3xCD20 в указанных составах)

Термосканирование

Состав	$T_{onset}$	$T_m$	$T_{agg}$ (по SLS при 266 нм)	$T_{agg}$ (по SLS при 473 нм)
	(по флуоресценции)			
Ацетат pH 5,5	58,7	62,7	59,0	59,5
Ацетат pH 5,5 + 150 мМ NaCl	57,1	59,0	57,7	57,8
Ацетат pH 5,5 + 150 мМ аргинина	56,6	59,0	57,3	57,7
Ацетат pH 5,5 + 150 мМ сорбитола	58,3	59,9	58,4	59,5
Гистидин pH 6,0	56,4	58,1	58,8	57,4
Гистидин pH 6,0 + 150 мМ NaCl	56,4	57,0	57,1	57,3
Гистидин pH 6,0 + 150 мМ аргинина	56,2	57,1	57,2	57,4
Гистидин pH 6,0 + 150 мМ сорбитола	56,8	58,4	56,6	57,0
Гистидин pH 6,5	56,9	58,6	55,1	58,0
Гистидин pH 6,5 + 150 мМ NaCl	56,7	57,5	57,7	57,7
Гистидин pH 6,5 + 150 мМ аргинина	56,7	57,5	57,5	57,5
Гистидин pH 6,5 + 150 мМ сорбитола	57,0	58,9	58,1	58,5

DLS

<b>Состав (буфер, рН, наполнитель)</b>	<b>Радиус (нм)</b>	<b>%Pd</b>
Ацетат рН 5,5	3,73	21,6
	3,76	23
Ацетат рН 5,5 + 150 мМ NaCl	8,31	16,9
	8,31	18,1
Ацетат рН 5,5 + 150 мМ аргинина	7,1	19,1
	6,91	17,3
Ацетат рН 5,5 + 150 мМ сорбитола	6,43	мультимодальный
	6,57	мультимодальный
Гистидин рН 6,0	4,72	23,9
	4,67	23,9
Гистидин рН 6,0 + 150 мМ NaCl	8,6	19,6
	8,56	19,9
Гистидин рН 6,0 + 150 мМ аргинина	8,06	23,9
	7,92	23,9
Гистидин рН 6,0 + 150 мМ сорбитола	5,67	мультимодальный
	5,55	мультимодальный
Гистидин рН 6,5	4,95	48,3
	4,56	23,6
Гистидин рН 6,5 + 150 мМ NaCl	10,6	46,2
	10,7	34,6
Гистидин рН 6,5 + 150 мМ аргинина	–	–
	–	–
Гистидин рН 6,5 + 150 мМ сорбитола	26,3	мультимодальный
	–	–

Кроме того, измеряли осмоляльность концентрированных образцов в ацетате рН 5,5 с сорбитолом или без него, в гистидиновом буфере рН 6,0 с сорбитолом и в гистидине рН 6,5 с сорбитолом с помощью осмометра. Результаты представлены в табл. 5.

Осмоляльность в ацетате рН 5,5 без сорбитола составляла 70-80 мОсм/кг. Осмоляльность препаратов с сорбитолом в ацетате или гистидине составляла 220-230 мОсм/кг, что ближе к осмоляльности нормальной плазмы (275-295 мОсм/кг; Rasouli 2016, Clin. Biochem. 49 (12):936-41).

**Таблица 5.** Осмоляльность препаратов дуотело CD3хCD20 (120-150 мг/мл) в указанных составах

<b>Состав</b>	<b>Осмоляльность (мОсм/кг)</b>
Ацетат рН 5,5	70-80
Ацетат рН 5,5 + 150 мМ сорбитола	220-230
Гистидин рН 6,0 + 150 мМ сорбитола	220-230
Гистидин рН 6,5 + 150 мМ сорбитола	220-230

Исходя из вышеприведенных результатов было установлено, что 30 мМ ацетата pH 5,5 со 150 мМ сорбитола является подходящим составом для дуотела CD3xCD20, так как ацетат с сорбитолом проявлял сравнимую термостойкость с гистидиновыми препаратами и в то же время наиболее эффективно поддерживал растворимость при высоких концентрациях (150 мг/мл) и обладал наименьшей вязкостью.

#### Стабильность в реальном времени и в ускоренном режиме

Определяли стабильность в реальном времени дуотела CD3xCD20 в 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, pH 5,5 по описанным методикам (внешний вид, pH, УФ [A<sub>280</sub>], SEC, iсIEF, CE-SDS [восстановительный и невосстановительный]) в различные моменты времени от 0 до 12 месяцев.

В табл. 6 представлены результаты испытаний на стабильность образцов дуотела CD3xCD20 (5 мг/мл), хранившихся при 5±3°C в течение 0, 2, 3 или 6 месяцев.

В табл. 7 представлены результаты испытаний на стабильность образцов дуотела CD3xCD20 (5 мг/мл), хранившихся при 25±3°C в течение 0, 1, 2, 3 или 6 месяцев.

В табл. 8 представлены результаты испытаний на стабильность образцов дуотела CD3xCD20 (60 мг/мл), хранившихся при 5±3°C в течение 0, 2, 3, 6, 9 или 12 месяцев.

В табл. 9 представлены результаты испытаний на стабильность образцов дуотела CD3xCD20 (60 мг/мл), хранившихся при 25±3°C в течение 0, 1, 2, 3 или 6 месяцев.

После хранения 12 месяцев при 5±3°C или 6 месяцев при 25±3°C, соответственно, все образцы оставались стабильными согласно всем методам испытаний в концентрациях 5 мг/мл и 60 мг/мл. Образцы, хранившиеся при 5±3°C, не проявляли существенных изменений ни в одном методе тестирования через 6 месяцев или 12 месяцев по сравнению с началом исследования. При ускоренном тестировании на стабильность при 25±3°C наблюдались ожидаемые незначительные изменения профиля чистоты методами УФ-спектрометрии, iсIEF, восстановительного CE-SDS и SEC.

**Таблица 6.** Типичные данные испытаний на стабильность дуотела CD3xCD20 (5 мг/мл) при 5±3°C

Метод	Время (месяцы)			
	0	2	3	6
pH	5,5	5,3	5,4	5,3
УФ-спектрофотометрия (мг/мл)	4,9 мг/мл	5,1 мг/мл	5,1 мг/мл	5,3 мг/мл
Восстановительный CE-SDS, основной пик, %	98,2%	96,1%	95,5%	97,3%
Восстановительный CE-SDS, % HC + LC	98,4%	96,7%	96,7%	95,9%
сIEF	CR	CR	CR	CR
сIEF, pI нейтрального пика	8,8	8,7	8,7	8,8
сIEF, кислые пики, %	63,6%	61,1%	62,8%	62,1%

cIEF, основной пик, %	34,4%	37,2%	35,6%	36,1%
cIEF, щелочные пики, %	2,0%	1,7%	1,6%	1,8%
SEC-UPLC, главный пик, %	97,4%	97,3%	97,6%	97,8%
SEC-UPLC, % HMW	2,5%	2,2%	2,0%	2,1%
SEC-UPLC, % LMW	0,2%	0,4%	0,5%	0,1%
Внешний вид	бесцветный прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	бесцветный прозрачный раствор, содержащий несколько нитевидных частиц	бесцветный прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	бесцветный прозрачный раствор, лишенный видимых частиц

**Таблица 7.** Типичные данные испытаний на стабильность дуотела CD3xCD20 (5 мг/мл) при 25±3°C

Метод	Время (месяцы)				
	0	1	2	3	6
pH	5,5	5,4	5,4	5,4	5,4
УФ-спектрофотометрия (мг/мл)	4,9 мг/мл	5,2 мг/мл	5,6 мг/мл	6,0 мг/мл	7,4 мг/мл
Невосстановительный CE-SDS, основной пик, %	98,2%	95,7%	95,2%	94,7%	95,9%
Восстановительный CE-SDS, % HC + LC	98,4%	96,1%	95,1%	94,6%	92,7%
cIEF	CR	CR	CR	CR	CR
cIEF, pI нейтрального пика	8,8	8,7	8,7	8,7	8,7
cIEF, кислые пики, %	63,6%	64,4%	65,6%	68,7%	74,7%
cIEF, основной пик, %	34,4%	33,8%	32,4%	29,2%	23,2%
cIEF, щелочные пики, %	2,0%	1,7%	2,0%	2,2%	2,2%
SEC-UPLC, главный пик, %	97,4%	97,6%	97,9%	97,0%	96,7%
SEC-UPLC, % HMW	2,5%	1,9%	1,9%	2,4%	2,7%
SEC-UPLC, % LMW	0,2%	0,4%	0,2%	0,6%	0,5%
Внешний вид	бесцветный прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	бесцветный прозрачный раствор, содержащий несколько нитевидных частиц	бесцветный прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	бесцветный прозрачный раствор, лишенный видимых частиц

**Таблица 8.** Типичные данные испытаний на стабильность дуотела CD3xCD20 (60 мг/мл) при 5±3°C

Метод	Время (месяцы)					
	0	2	3	6	9	12
pH	5,51	5,4	5,5	5,4	5,4	5,4
УФ-спектрофотометрия (мг/мл)	61,5 мг/мл	65,1 мг/мл	66,0 мг/мл	66,4 мг/мл	69,1 мг/мл	71,4 мг/мл

Восстановительный CE-SDS, % HC	64,9%	64,9%	65,1%	64,3%	63,5%	64,3%
Восстановительный CE-SDS, % LC	31,9%	31,6%	31,7%	31,6%	32,4%	31,5%
Восстановительный CE-SDS, % NGHC	0,9%	0,7%	0,6%	0,7%	0,8%	0,8%
Невосстановительный CE-SDS, основной пик	98,3%	95,8%	95,4%	96,4%	97,1%	97,0%
SEC-UPLC, главный пик	98,1%	96,7%	96,3%	96,5%	96,1%	95,9%
SEC-UPLC, % HMW	1,7%	3,1%	3,3%	3,5%	3,7%	3,8%
SEC-UPLC, % LMW	0,2%	0,2%	0,5%	0,1%	0,2%	0,3%
cIEF, основной пик, %	33,9%	36,1%	35,9%	35,5%	35,9%	34,2%
cIEF, кислые пики, %	64,0%	62,3%	62,4%	63,0%	62,2%	63,5%
cIEF, щелочные пики, %	2,1%	1,6%	1,7%	1,7%	1,9%	2,3%
Внешний вид	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	желтоватый прозрачный раствор, содержащий несколько нитевидных частиц	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	желтоватый прозрачный раствор, содержащий несколько волокнистых частиц	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц

**Таблица 9.** Типичные данные испытаний на стабильность дуотела CD3хCD20 (60 мг/мл) при 25±3°C

Метод	Время (месяцы)				
	0	1	2	3	6
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
УФ-спектрофотометрия (мг/мл)	61,5 мг/мл	65,8 мг/мл	71,7 мг/мл	75,9 мг/мл	93,3 мг/мл
Восстановительный CE-SDS, % HC	64,9%	64,7%	63,8%	63,1%	61,6%
Восстановительный CE-SDS, % LC	31,9%	31,7%	31,8%	32,0%	32,1%
Восстановительный CE-SDS, % NGHC	0,9%	0,8%	0,9%	1,1%	1,3%
Невосстановительный CE-SDS, основной пик, %	98,3%	95,4%	94,9%	94,2%	93,2%
SEC-UPLC, главный пик	98,1%	95,7%	95,5%	94,7%	93,8%
SEC-UPLC, % HMW	1,7%	3,7%	4,1%	4,6%	5,7%
SEC-UPLC, % LMW	0,2%	0,6%	0,5%	0,7%	0,5%
cIEF, основной пик, %	33,9%	35,7%	31,9%	31,2%	26,2%
cIEF, кислые пики, %	64,0%	62,7%	66,0%	66,6%	71,5%

сIEF, щелочные пики, %	2,1%	1,6%	2,1%	2,1%	2,3%
Внешний вид	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	бесцветный прозрачный раствор, содержащий белые нитевидные частицы	желтоватый прозрачный раствор, содержащий несколько нитевидных частиц	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц	желтоватый прозрачный раствор, лишенный видимых частиц

### Выводы

Исходя из результатов, полученных при аналитическом тестировании дуотела CD3xCD20 в различных составах, оптимальным составом для этой молекулы было 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, pH 5,5. Мы показали, что дуотело CD3xCD20 стабильно при 5 и 60 мг/мл (в 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, pH 5,5) вплоть до 12 месяцев при 5±3°C. Более того, при ускоренном тестировании на стабильность при 25±3°C наблюдались лишь незначительные ожидаемые изменения дуотела CD3xCD20 при 5 и 60 мг/мл (в 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, pH 5,5) вплоть до 6 месяцев.

### **Пример 2. Исследования по стабильности препарата дуотела CD3xCD20 (5мг/мл) с ПАВ и без него**

Препарат содержал 5 мг/мл дуотела CD3xCD20, а методы описаны в примере 1. Для дальнейшего воздействия на него проводились исследования по замораживанию-оттаиванию препарата. Образцы замораживали в камере при -75°C в течение по меньшей мере 2 часов и оттаивали при комнатной температуре (23°C) в течение 2 часов. Эту процедуру повторяли 5 раз. В этом испытании на замораживание-оттаивание при визуальном осмотре проявлялись некоторые частицы в препарате, содержащем дуотело CD3xCD20 при 5 мг/мл в 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, pH 5,5. При добавлении в препарат 0,04% мас./об. полисорбата 80 после пяти циклов замораживания-оттаивания при визуальном осмотре наблюдалось лишь очень небольшое количество частиц. Далее проводили сравнение образцов через 2, 4, 8 и 12 недель при 2-8°C, 25°C и 40°C. Результаты этих исследований представлены в табл. 10. Из этих результатов видно, что добавление 0,04% полисорбата 80 улучшало физическую стабильность антител за счет снижения уровня видимых частиц. Аналогичные результаты отмечались и для субвидимых частиц при анализе методом микропроточной визуализации (данные не приводятся). Эти данные поддерживают добавление ПАВ в препараты биспецифичных антител по изобретению.

**Таблица 10.** Типичные данные испытаний на стабильность препаратов дуотела CD3xCD20 (5 мг/мл) с ПАВ и без него

Образец	Время	Условия	Частицы
5 мг/мл дуотело CD3xCD20 (30мМ ацетата, 150мМ сорбитола, рН 5,5)	исходно	н/п	очень мало частиц
		перемешивание	очень мало частиц
		замораживание-оттаивание	есть частицы
	2 недели	2-8°C	очень мало частиц
		25°C/60%RH	очень мало частиц
		40°C/75%RH	очень мало частиц, нитевидные
	4 недели	2-8°C	очень мало частиц
		25°C/60%RH	очень мало частиц, нитевидные
		40°C/75%RH	очень мало частиц
	8 недель	2-8°C	немного частиц
		25°C/60%RH	есть частицы
		40°C/75%RH	есть частицы
	12 недель	2-8°C	немного частиц
		25°C/60%RH	есть частицы
		40°C/75%RH	немного частиц
5 мг/мл дуотело CD3xCD20 (30мМ ацетата, 150мМ сорбитола, рН 5,5, 0,04% PS80)	исходно	н/п	нет видимых частиц
		перемешивание	нет видимых частиц
		замораживание-оттаивание	очень мало частиц
	2 недели	2-8°C	нет видимых частиц
		25°C/60%RH	нет видимых частиц
		40°C/75%RH	нет видимых частиц
	4 недели	2-8°C	нет видимых частиц
		25°C/60%RH	нет видимых частиц
		40°C/75%RH	нет видимых частиц
	8 недель	2-8°C	нет видимых частиц
		25°C/60%RH	нет видимых частиц
		40°C/75%RH	нет видимых частиц
	12 недель	2-8°C	нет видимых частиц
		25°C/60%RH	нет видимых частиц
		40°C/75%RH	нет видимых частиц

**Пример 3. Исследования по стабильности препарата дуотело CD3xCD20 (5мг/мл) с ПАВ, сорбитолом и гистидином или ПАВ, сорбитолом и ацетатным буфером**

Тестировали гистидинсорбитоловый препарат, похожий на широко используемые в промышленности препараты, и сравнивали с предпочтительной композицией по изобретению. Было обнаружено, что гистидиновый препарат уступает текущему составу на основе ацетата при анализе методом эксклюзионной хроматографии после инкубации в условиях стресса (40°C) в течение 8 и 12 недель, см. табл. 11. Это видно по резкому возрастанию % высокомолекулярных (% НМВ) частиц в гистидиновом препарате в этих

условиях по сравнению с ацетатным препаратом.

**Таблица 11.** Типичные данные испытаний на стабильность препаратов дуотела CD3xCD20 (5 мг/мл) с ПАВ, но в разных буферах

Образец	Время	Условия	% HMW	% мономера	% LMW
5 мг/мл дуотело CD3xCD20 (30мМ ацетата, 150мМ сорбитола, рН 5,5)	исходно	н/п	4,0	95,9	0,1
		замораживание-оттаивание	4,1	95,8	0,1
		перемешивание	4,0	95,9	0,1
	2 недели	2-8°C	4,1	95,8	0,1
		25°C/60%RH	4,2	95,7	0,1
		40°C/75%RH	4,3	95,4	0,3
	4 недели	2-8°C	4,1	95,7	0,1
		25°C/60%RH	4,2	95,6	0,2
		40°C/75%RH	4,5	94,9	0,6
	8 недель	2-8°C	4,2	95,7	0,1
		25°C/60%RH	4,2	95,6	0,3
		40°C/75%RH	4,9	93,8	1,3
	12 недель	2-8°C	4,2	95,6	0,1
		25°C/60%RH	4,4	95,3	0,3
		40°C/75%RH	5,2	93,0	1,8
5 мг/мл дуотело CD3xCD20 (30мМ ацетата, 150мМ сорбитола, рН 5,5, 0,04% PS80)	исходно	н/п	4,4	95,5	0,1
		замораживание-оттаивание	4,3	95,6	0,1
		перемешивание	4,3	95,5	0,1
	2 недели	2-8°C	4,5	95,4	0,1
		25°C/60%RH	4,5	95,4	0,2
		40°C/75%RH	4,6	95,0	0,4
	4 недели	2-8°C	4,4	95,4	0,1
		25°C/60%RH	4,5	95,3	0,2
		40°C/75%RH	4,9	94,4	0,7
	8 недель	2-8°C	4,6	95,3	0,1
		25°C/60%RH	4,6	95,1	0,3
		40°C/75%RH	5,8	92,8	1,4
	12 недель	2-8°C	4,5	95,3	0,1
		25°C/60%RH	4,7	95,0	0,4
		40°C/75%RH	6,6	91,4	2,0
	исходно	н/п	4,4	95,5	0,1
		замораживание-оттаивание	4,3	95,6	0,1
		перемешивание	4,3	95,5	0,1

5 мг/мл дуотело CD3xCD20 (30мМ гистидина, 250мМ сорбитола, рН 5,5, 0,04% PS80)	2 недели	2-8°C	4,5	95,4	0,1
		25°C/60%RH	4,5	95,4	0,2
		40°C/75%RH	4,6	95,0	0,4
	4 недели	2-8°C	4,4	95,4	0,1
		25°C/60%RH	4,5	95,3	0,2
		40°C/75%RH	4,9	94,4	0,7
	8 недель	2-8°C	4,6	95,3	0,1
		25°C/60%RH	4,6	95,1	0,3
		40°C/75%RH	5,8	92,8	1,4
	12 недель	2-8°C	4,5	95,3	0,1
		25°C/60%RH	4,7	95,0	0,4
		40°C/75%RH	6,6	91,4	2,0

#### Пример 4. Анализ цитокинов в крови яванских макак, получавших дуотело CD3xCD20 внутривенным (в/в) и подкожным (п/к) введением

Брали пробы крови у животных при исследовании по определению диапазона доз (DRF) дуотела CD3xCD20 на самках яванских макак и GLP-исследовании по токсикологии дуотело CD3xCD20 на самках и самцах яванских макак при  $t=0$  (до введения дозы) и через 2, 4, 6, 12 и 24 часа. Образцы (0,25 мл) переносили в содержащие  $K_2EDTA$  пробирки и обрабатывали для получения плазмы центрифугированием при 3000 об/мин (примерно 1500 g) в течение 10 мин при 4°C. Плазму переносили в прозрачные полипропиленовые пробирки на 0,5 мл и хранили при -80°C до анализа.

Анализ образцов проводили по методике производителя с помощью набора магнитных шариков Milliplex MAP NHP Cytokine Magnetic Bead Panel (Millipore, кат. №. PRCYTOMAG-40K) для измерения концентрации IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-15, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и MCP-1 на считывающем устройстве BioPlex 200 (BioRad).

На фиг. 3 представлены средние уровни цитокинов на 1 группу в крови животных, получавших однократную внутривенную дозу (0,1 или 1 мг/кг) или однократную подкожную дозу (0,1 или 1 мг/кг) дуотела CD3xCD20 в фармацевтической композиции по изобретению при GLP-исследовании по токсикологии.

Введение дуотела CD3xCD20 вызывало только низкие уровни (менее 150 пг/мл) цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-12p40 и IL-15 (фиг. 3А).

Цитокины IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и MCP-1 более четко индуцировались при внутривенном введении дуотела CD3xCD20, достигая пика в пределах 2-12 часов после введения (фиг. 3В). После этого уровни цитокинов возвращались на исходный уровень. Для каждого из этих цитокинов пиковые уровни были ниже в крови животных при подкожном введении (0,1 или 1 мг/кг), чем при соответствующем внутривенном

введении. Для IL-8 и IFN- $\gamma$  пиковые уровни были ниже и появлялись с задержкой при подкожном введении по сравнению с внутривенным введением.

Аналогичные результаты наблюдались и при исследовании DRF, за исключением того, что в этом (меньшем) исследовании не было отличий по уровням IFN $\gamma$  между животными при внутривенном или подкожном введении.

**Пример 5. Оценка истощения В-клеток у яванских макак после 4-кратного внутривенного введения, однократного внутривенного введения начальной дозы или однократного подкожного введения дуотела CD3xCD20 (исследование по определению диапазона доз)**

Самки яванских макак получали дуотело CD3xCD20 в препаратах по изобретению (30 mM ацетата, 150 mM сорбитола, pH 5,5) при 4-кратном внутривенном введении раз в неделю (0,01, 0,1 или 1 мг/кг), при внутривенном введении начальной дозы (0,01 мг/кг) с последующей целевой дозой в 1 мг/кг внутривенно либо при однократном подкожном введении (0,01, 0,1, 1, 10 или 20 мг/кг), по следующей схеме:

№ группы	Способ введения	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Концентрация дозы (мг/мл)	Дни введения	Количество самок
1	IV (в/в)	0,01	10	0,001	1, 8, 15, 22	2
2	IV (в/в)	0,1	10	0,01	1, 8, 15, 22	2
3	IV (в/в)	1	10	0,1	1, 8, 15, 22	2
4	IV (в/в)	0,01/1	10	0,001/0,1	1, 2	2
5	SC (п/к)	1	1	1	1	2
6	SC (п/к)	10	1	10	1	2
7	SC (п/к)	20	1	20	36	2
8	SC (п/к)	0,01	1	0,01	57	2
9	SC (п/к)	0,1	1	0,1	57	2

(День в таблице отражает фактический день исследования)

Исследование проводилось на фирме Charles River Laboratories (Tranent, UK) в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Совет Европы), под контролем Министерства внутренних дел Великобритании.

Специально разводимых яванских макак, *Macaca fascicularis*, маврикийского происхождения, получали от Bioculture (Mauritius) Limited (Riviere de Anguilles, Маврикий) или Noverprim (Mahebourg, Маврикий). Животных содержали социально в групповых загонах с обогащенной окружающей средой.

Получение образцов

Брали пробы цельной крови (примерно 0,5 мл) из бедренной вены с помощью стерильных игл для подкожных инъекций и стерильных шприцев. Для

иммунофенотипирования методом проточной цитометрии переносили кровь в пробирки с гепарином натрия и хранили при комнатной температуре до анализа в пределах 48 часов.

Делали биопсию (примерно 20 мг) поверхностных лимфатических узлов, прорезая лимфатический узел по единичной методике асептической хирургии, когда животные были под общим наркозом. Биоптаты собирали в Roswell Park Memorial Institute (RPMI) и хранили на влажном льду до обработки в пределах 24 часов. Готовили суспензии отдельных клеток с помощью системы Medimachine для автоматизированного механического разрушения тканей (Becton Dickinson; насчет подробностей см. полные отчеты по исследованиям CRL). Полученные клетки ресуспендировали в 2 мл фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (PBS; Gibco, кат. № 14190).

Во время вскрытия образцы из лимфатических узлов и селезенки насаживали на пробковые диски, по отдельности заворачивали в алюминиевую фольгу, снабжали индивидуальной этикеткой, быстро замораживали в жидком азоте и помещали в морозильную камеру, настроенную на поддержание температуры при  $-80^{\circ}\text{C}$  в ожидании исследования по иммуногистохимии.

#### Проточная цитометрия

В круглодонных пробирках (Falcon, кат. № 352052) готовили смеси непосредственно меченых антител (см. ниже). Смеси антител выбирали так, чтобы можно было также анализировать В-клетки  $\text{CD}19^{+}$ .

Для иммунофенотипирования периферической крови в смесь антител вносили 50 мкл цельной крови с антикоагулянтом и инкубировали в защищенном от света месте при комнатной температуре в течение 20 мин. Эритроциты (RBCs) лизировали с помощью буфера для лизиса 1xRBC (eBioscience, кат. № 00-4300-54) при комнатной температуре в течение 10 мин (или до полного лизиса RBCs). Пробирки центрифугировали при 300-500 g при комнатной температуре в течение 5 мин. Супернатанты отбрасывали, а осадки клеток ресуспендировали в 0,5 мл PBS (Gibco, кат. № 10010). Перед анализом в каждую пробирку добавляли 50 мкл шариков Flow Count (Beckman Coulter, кат. № 7546053).

Для иммунофенотипирования клеток лимфатических узлов в смесь антител вносили 50 мкл суспензии клеток и инкубировали в защищенном от света месте на льду в течение 15 мин. После инкубации в каждую пробирку добавляли 0,5 мл PBS по Дюльбекко.

Анализ образцов проводили с помощью двухлазерного пятицветного проточного цитометра Beckman Coulter FC500 или BD LSR Fortessa X-20. Случаи  $\text{CD}4^{-}\text{CD}8^{-}\text{CD}15^{-}\text{CD}19^{+}$  классифицировались как В-клетки.

Использовали смеси следующих антител:

Антитело <sup>1</sup>	Поставщик	Кат. №
CD4-FITC	BD Biosciences	550628
CD16-ECD	Beckman Coulter	A33098/B49216*
CD8-PC5	Beckman Coulter	A07758
CD19-PE-Cy7	Beckman Coulter	IM3628

<sup>1</sup> FITC: флуоресцеинизотиоцианат; PE: фикоэритин; ECD: электронносопряженный краситель; BV: бриллиантовый фиолетовый; V: фиолетовый; Cy: цианиновый краситель; APC: аллофикоцианин; \* поставщик изменил каталожный номер антитела во время исследования.

### Иммуногистохимия

Из замороженных лимфатических узлов и селезенки, взятых во время вскрытия, делали срезы и окрашивали с помощью антител против CD19 (Abcam, кат. № ab134114) по единичным методикам иммуногистохимии.

### **Результаты**

Неоднократное внутривенное и однократное подкожное введение, а также внутривенное введение с начальной дозой вызывало дозозависимое истощение В-клеток из периферической крови и лимфатических узлов (фиг. 4-9). При 0,01 мг/кг первые две внутривенные дозы вызывали истощение В-клеток до (почти) необнаруживаемого уровня. 3-я и 4-я дозы не вызывали или вызывали частичное истощение В-клеток. Такое отсутствие эффекта после нескольких доз может быть связано с образованием антител против препарата. Неоднократное внутривенное введение по 0,1 или 1 мг/кг вызывало полное истощение В-клеток с (частичным) восстановлением через 21 день (0,1 мг/кг) или через 42-119 дней (1мг/кг). Однократное подкожное введение дуотела CD3xCD20 в фармацевтической композиции по изобретению (30 mM ацетата, 150 mM сорбитола, pH 5,5) вызывало истощение В-клеток из кровотока и лимфатических узлов до необнаруживаемого уровня при всех уровнях доз. Восстановление В-клеток наблюдалось во всех группах с возвращением на исходный уровень через несколько недель при низких дозах и примерно через 70 дней после введения при высоких дозах. Внутривенное введение начальной дозы (0,01 мг/кг) с последующим введением целевой дозы 1 мг/кг на следующий день приводило к полному истощению В-клеток из периферической крови и лимфатических узлов вплоть до дня запланированного вскрытия (день 29). В этом исследовании истощение В-клеток из лимфатических узлов и селезенки проверяли по иммуногистохимии (фиг. 10).

**Пример 6. Истощение В-клеток у яванских макак после 5-кратного внутривенного введения или однократного подкожного введения дуотела CD3xCD20 (GLP-исследование по токсичности)**

Самцы и самки яванских макак получали дуотело CD3xCD20 в фармацевтической

композиции по изобретению при 5-кратном внутривенном введении раз в неделю (0,01, 0,1 или 1 мг/кг), при однократном внутривенном введении (0,1 или 1 мг/кг) или подкожном введении (0,1, 1 или 10 мг/кг); также включали и контрольную группу с 5-кратным внутривенным введением физраствора раз в неделю, по следующей схеме:

№ группы	Тест-элемент	Способ введения	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Конц. дозы (мг/мл)	Количество животных			
						Исследование		Восстановление	
						самцы	самки	самцы	самки
1	контроль (физраствор)	в/в (1qwx5)	0	10	0	3	3	2	2
2	дуотело CD3xCD20	в/в (1qwx5)	0,01	10	0,001	3	3	-	-
3		в/в (1qwx5)	0,1	10	0,01	3	3	-	-
4		в/в (1qwx5)	1,0	10	0,1	3	3	2	2
5		в/в (SD)	0,1	10	0,01	3	3	-	-
6		в/в (SD)	1,0	10	0,1	3	3	-	-
7		п/к (2x SD)	0 + 0,1	0,2	0 + 0,5	3	3	-	-
8		п/к (2x SD)	0 + 1,0	0,2	0 + 5	3	3	-	-
9		п/к (2x SD)	0 + 10	0,2	0 + 50	3	3	-	-

1qwx5 = 1 раз в неделю внутривенно пять раз (дни 1, 8, 15, 22 и 29); прекращение: день 36 (основное исследование); прекращение: день 71 (восстановление);

в/в SD = однократная доза внутривенно (день 1); прекращение: день 36;

п/к 2x SD = подкожная доза дуотело CD3xCD20 с подкожным носителем (30 мМ ацетатного буфера, 150 мМ сорбитола, pH 5,5) в дни 1 и 29, разные места инъекции у одного и того же животного; прекращение: день 33.

Исследование проводилось на фирме Charles River Laboratories (Tranent, UK) в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Совет Европы), под контролем Министерства внутренних дел Великобритании.

Специально разводимых яванских макак, *Macaca fascicularis*, маврикийского происхождения, получали от LCL-Cynologics (Port-Louis, Маврикий). Животных содержали социально в групповых загонах с обогащенной окружающей средой.

Образцы цельной крови и биоптаты лимфатических узлов получали, как описано выше.

Определение В-клеток проводили методом проточной цитометрии, как описано выше, за исключением того, что:

- для иммунофенотипирования периферической крови в смесь антител вносили 50 мкл цельной крови с антикоагулянтом и инкубировали в защищенном от света месте при +4°C в течение 30 мин, и
- при сборе данных использовали пробирки TruCount (BD Biosciences).

Случаи CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD15<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> классифицировались как В-клетки.

Использовали смеси следующих антител:

Антитело <sup>1</sup>	Поставщик	Кат. №
CD45-V500/CD45-BV711*	BD Biosciences	561489/740809
CD16-BV650	Biolegend	302042
CD4-FITC	BD Biosciences	550628
CD19-APC	Beckman Coulter	IM2470
CD8-APC-H7	BD Biosciences	560179

<sup>1</sup> FITC: флуоресцеинизотиоцианат; PE: фикоэритин; ECD: электронносопряженный краситель; BV: бриллиантовый фиолетовый; V: фиолетовый; Cy: цианиновый краситель; APC: аллофикоцианин.

\* Во время исследования CD45-V500 было временно заменено на CD45-BV711 из-за проблем с поставщиком; CD45-V500 было возвращено после решения проблем с поставщиком. Поскольку они детектируются на разных фильтрах, CD25-BV711 было временно заменено на CD25-V510.

### Результаты

Результаты представлены на фиг. 11-16. Внутривенное введение физраствора частично снижало число В-клеток в периферической крови, однако число В-клеток возвращалось на исходный уровень в пределах 3 недель после последнего введения. Пятикратное внутривенное введение дуотела CD3xCD20 раз в неделю вызывало дозозависимое истощение В-клеток с частичным истощением в группе с низкой дозой и длительным полным истощением в группах с высокой дозой. Однократное внутривенное введение 0,1 или 1 мг/кг вызывало полное истощение В-клеток из периферической крови, причем истощение продолжалось до дня вскрытия (день 36) при наибольшей исследованной дозе. Подкожное введение дуотела CD3xCD20 приводило к полному истощению В-клеток из периферической крови при всех исследованных уровнях доз. При самой низкой дозе уровни В-клеток частично восстанавливались, тогда как в группах 1 и 10 мг/кг полное истощение В-клеток сохранялось вплоть до дня вскрытия (день 33).

### **Пример 7. Фармакокинетика дуотела CD3xCD20 у яванских макак при внутривенном (в/в) и подкожном (п/к) введении**

#### Материалы и методы

Определяли фармакокинетические (ПК) свойства дуотела CD3xCD20 в составе 30 mM ацетатного буфера, 150 mM сорбитола при pH 5,5 на яванских макаках в исследованиях по токсикологии при оценке внутривенного (в/в) и подкожного (п/к) способов введения. Брали пробы крови у животных при исследовании по определению диапазона доз (DRF) дуотела CD3xCD20 на самках яванских макак, а также при GLP-исследовании по токсикологии дуотело CD3xCD20 на яванских макаках. Схемы и

подробности этих исследований описаны в примере 4. Определение РК проводили на животных при однократном внутривенном или подкожном введении. У всех животных получали образцы крови (примерно по 0,5 мл) для определения концентрации дуотела CD3xCD20 в плазме. Концентрации дуотела CD3xCD20 в плазме яванских макак из исследования по DRF определяли методом иммуно-ПЦР Imperacer<sup>®</sup>. Концентрации дуотела CD3xCD20 в плазме яванских макак из GLP-исследования по токсикологии определяли методом подсчета отдельных молекул (SMC). Подробности этих определений представлены в следующих разделах.

#### **Специфичный к дуотелу CD3xCD20 метод иммуно-ПЦР Imperacer<sup>®</sup> для РК**

Концентрации дуотела CD3xCD20 в плазме яванских макак из исследования по DRF определяли методом Imperacer<sup>®</sup>, усовершенствованным сверхчувствительным методом иммунополимеразной цепной реакции (ПЦР), в котором используются конъюгаты антитело-ДНК и последующая экспоненциальная амплификация ДНК-маркера для выявления белка. Вкратце, образцы дуотело CD3xCD20 для калибровочной кривой по 8 точкам в 100% плазме яванских макак, контроли качества (QC) и (разведенные) исследуемые образцы яванских макак разбавляли буфером для разведения образцов SDB6000, содержащим конъюгат CHI-SAB1 A1 для Imperacer<sup>®</sup> (Chimera Biotec GmbH, Dortmund, Германия, кат. № 11-272). Образцы вносили в 96-луночный планшет для ELISA, покрытый помеченным His внеклеточным доменом CD3 (CD3ECDHis; Genmab, Utrecht, Нидерланды), с которым может связываться дуотело CD3xCD20. Планшеты отмывали, добавляли специальную смесь для ПЦР (Molzum, кат. № C-022) и переносили образцы в считывающее устройство для RT-PCR Imperacer<sup>®</sup> (Enabled RT Cycler MX 3000P/MX 3005P фирмы Agilent Technologies/Chimera). Имобилизованное дуотело CD3xCD20 можно детектировать при ПЦР-амплификации ДНК-маркера, входящего в детектирующий конъюгат для Imperacer<sup>®</sup>. При обработке специфичного для последовательности флуоресцентного зонда в специальной смеси для ПЦР происходит повышение сигнала флуоресценции, которое напрямую связано с исходным количеством ДНК-маркера и отмечается как сигнал  $\Delta C_t$ . По завершении генерации сигнала ПЦР в реальном времени данные по измерению флуоресценции обрабатываются с помощью программного обеспечения прибора (MXPro; Chimera Biotec GmbH) и анализируются с помощью математической программы (Microsoft Excel, модуль для анализа XLfit). Концентрацию связавшегося дуотело CD3xCD20 определяли по единичной кривой, которую строили путем нанесения сигналов  $\Delta C_t$  на график зависимости от логарифма концентрации внесенного дуотело CD3xCD20 по нелинейной сигмоидальной регрессии по 4-параметрам. Этот метод был поставлен и выполнялся на фирме Chimera Biotec GmbH,

Dortmund. LLOQ составлял 1,0 пг/мл неразбавленной плазмы.

### **Метод подсчета отдельных молекул (SMC) дуотела CD3xCD20 для РК**

Концентрации дуотела CD3xCD20 в плазме яванских макак из GLP-исследования по токсикологии определяли методом подсчета отдельных молекул (SMC). Иммуноанализ SMC представляет собой метод флуоресцентного сэндвичиммуноанализа, которым можно измерять молекулы дуотела CD3xCD20 в плазме яванских макак.

Вкратце, калибровочные образцы, QC и исследуемые образцы фильтровали перед использованием, а магнитные шарики метили антиидиотипическим антителом, направленным против CD3-плеча дуотела CD3xCD20 (UM-IgG1mm-3005-101-3-1-MP; Genmab, Utrecht, Нидерланды), в соответствии с методикой производителя (Merck Millipore, кат. № 03-0077-02). Профильтрованные образцы инкубировали с покрытыми магнитными частицами с антиидиотипическим антителом, направленным против CD20-плеча дуотела CD3xCD20, связанным с флуорохромом (UM-IgG1mm-3005-101-3-1-MP; Genmab, Utrecht, Нидерланды). После инкубации частицы промывали для удаления несвязавшегося конъюгата. Затем магнитные частицы со связанным анализом и конъюгатом переносили на чистый планшет и отсасывали оставшийся буфер. Анализ и конъюгат отделяли от магнитных частиц с помощью элюирующего буфера по методике производителя (Merck Millipore), а элюат переносили в 384-луночный планшет, содержащий нейтрализующий буфер. Образцы вводили в капилляр с помощью системы подсчета отдельных молекул Egenna® (Merck/Millipore) и освещали лазером. Молекулы с флуоресцентной меткой излучают свет, а сигналы выше порога подсчитываются как детектируемые события. Кроме того, измеряли уровень света при каждом событии (событийные фотоны) и общий уровень света (общее количество фотонов).

Этот метод был поставлен и выполнялся в лаборатории PRA Health Sciences Bioanalytical Laboratory (PRA), Assen, Нидерланды. Во время проверки LLOQ был определен на уровне 0,100 нг/мл неразбавленной плазмы, а верхний предел определения (ULOQ) – на уровне 50 нг/мл неразбавленной плазмы.

### **Результаты**

Исследование по определению диапазона доз: однократная внутривенная доза с начальной дозой

Определяли профили концентраций дуотела CD3xCD20 в плазме у яванских макак, получавших начальную дозу 0,01 мг/кг дуотела CD3xCD20 в день 1, а затем целевую дозу 1 мг/кг дуотела CD3xCD20 в день 2 (n = 2 самки). И начальную дозу, и целевую дозу вводили в виде внутривенной инфузии в объеме дозы 10 мл/кг на протяжении 30 минут. После внутривенного введения дуотела CD3xCD20 в целевой дозе 1 мг/кг (день 2),

которому предшествовала начальная внутривенная доза 0,01 мг/кг (день 1),  $C_{\max}$  достигалась сразу же под конец вливания дозы в 1 мг/кг. Значения  $C_L$  (10,7-13,7 мл/день/кг) и значения  $V_D$  (56,1-64,9 мл/кг) такого же порядка наблюдались после первой дозы и в группе с внутривенным введением нескольких доз.

Индивидуальные профили концентраций в плазме, полученные методом иммуно-ПЦР Impregaseg, представлены на фиг. 17А, а средние групповые параметры РК представлены в табл. 12. Параметры РК рассчитывали только для дозы 1 мг/кг.

**Таблица 12.** Однократная внутривенная доза: средние параметры РК для дуотела CD3xCD20 в исследовании по DRF

Доза (мг/кг)	$T_{\max}$ (дни)	$C_{\max}$ (мкг/мл)	$AUC_{0-\infty}$ (нг·день/мл)	$T_{1/2}$ (дни)	$C_L$ (мл/день·кг)	$V_D$ (мл/кг)
0,01 + 1	0	51,6	83259	3,46	12,2	60,5

Исследование по определению диапазона доз: однократная подкожная доза

Определяли профили концентраций дуотела CD3xCD20 в плазме после однократного подкожного введения дозы дуотела CD3xCD20 при уровне доз в 0,01, 0,1, 1, 10 или 20 мг/кг (n = 2 самки на группу). Подкожное введение проводили в объеме дозы 1 мл/кг.  $C_{\max}$  достигалась между 0,5 и 7 днями после введения дозы. Исходя из  $nC_{\max}$  либо  $AUC_{0-\infty}$ , наблюдалось сверхпропорциональное повышение экспозиции вплоть до дозы 1 мг/кг. А между 1 мг/кг и 20 мг/кг наблюдалось пропорциональное повышение экспозиции с возрастанием дозы. Индивидуальные профили концентраций в плазме, полученные методом иммуно-ПЦР Impregaseg<sup>®</sup>, представлены на фиг. 17В, а средние групповые параметры РК представлены в табл. 13.

Рассчитывали абсолютную подкожную биодоступность (F) как процент от внутривенной биодоступности, используя значения  $AUC_{inf}$  после подкожного введения 1 мг/кг и  $AUC_{0-\infty}$  после первой внутривенной дозы 1 мг/кг, которая оказалась равной 111%, что означает полную (100%) подкожную биодоступность при этой дозе.

**Таблица 13.** Однократная подкожная доза: средние параметры РК для дуотела CD3xCD20 в исследовании по DRF

Доза (мг/кг)	$T_{\max}$ (дни)	$C_{\max}$ (мкг/мл)	$nC_{\max}$ (мкг/мл)/ (мг/кг)	$T_{1/2}$ (дни)	$AUC_{0-\infty}$ (нг·час/мл)	$AUC_{0-\infty}$ (нг·день/мл)/ (мг/кг)
0,01	0,334	0,00063	0,063	31,7 (n=1)	4,67 (n=1)	
0,1	5	0,049	0,49	12,1	385	
1	5	5,43	5,43	3,68	49004	467,3 (n=1)
10	1,75	62,1	6,21	3,34	653611	3848
20	1,75	69,2	3,45	3,81	693552	49004

GLP-исследование токсичности: однократная внутривенная доза

Определяли профили концентраций дуотела CD3xCD20 в плазме после однократного внутривенного введения дозы дуотела CD3xCD20 при уровне доз в 0,1 или 1 мг/кг (по 3 самки/самца на группу). Средние групповые профили концентраций в плазме, полученные методом SMC, представлены на фиг. 17С, а средние групповые фармакокинетические параметры представлены в табл. 14. Системная экспозиция дуотелу CD3xCD20 (исходя из средних значений  $C_{max}$  и  $AUC_{0-t}$ ) возрастала с повышением дозы и у самцов, и у самок. Исходя из нормированных по дозе значений, системная экспозиция дуотелу CD3xCD20 обычно повышалась более чем пропорционально дозе в диапазоне доз от 0,1 до 1 мг/кг и у самцов, и у самок. Медианное значение  $T_{max}$  обычно составляло 0,5 часа (конец периода вливания). Отмечалась тенденция к снижению  $C_L$ ,  $V_D$  и  $V_{SS}$  при возрастании дозы.  $T_{1/2}$ , вероятно, был надлежащим образом рассчитан при более высокой дозе 1 мг/кг (средние значения 98 и 125 часов у самцов и самок, соответственно), когда фаза элиминации составляла до 840 часов у обоих полов по сравнению со 168 или 336 часами при 0,1 мг/кг. Системная экспозиция обычно была сравнима между самцами и самками при дозах 0,1 и 1 мг/кг, хотя среднее значение  $AUC_{0-t}$  при дозе 0,1 мг/кг было выше у самцов, чем у самок. Вероятно, это из-за особенностей одного животного, у которого общая экспозиция была примерно в 7 раз больше, чем у всех других животных. С учетом вариабельности из-за этого животного соотношение  $C_{max}$  и  $AUC_{0-t}$  у самок/самцов составляло от 0,8 до 1,3 (0,3 для  $AUC_{0-t}$  при 0,1 мг/кг).

**Таблица 14.** Однократная внутривенная доза: средние параметры РК дуотела CD3xCD20 в GLP-исследовании по токсикологии

Доза (мг/кг)	$T_{max}$ (ч)	$C_{max}$ (нг/мл)	$AUC_{0-\infty}$ (нг·ч/мл)	$T_{1/2}$ (ч)	$C_L$ (мл/ч·кг)	$V_D$ (мл/кг)
0,1	0,5	1610 (M)	13500 (M)	47,5 (M)	21,6 (M)	1060 (M)
		1300 (F)	4280 (F)	32,7 (F)	24,1 (F)	1160 (F)
1	0,5	21600 (M)	615000 (M)	98,4 (M)	1,63 (M)	233 (M)
		28400 (F)	840000 (F)	125 (F)	1,21 (F)	226 (F)

M – самцы, F – самки.

#### Однократная подкожная доза

Определяли профили концентраций дуотела CD3xCD20 в плазме после однократного подкожного введения дозы дуотела CD3xCD20 при уровне доз в 0,1, 1 или 10 мг/кг (по 3 самки/самца на группу). Подкожное введение проводилось в объеме дозы 1 мл/кг. Средние групповые профили концентраций в плазме, полученные методом SMC, представлены на фиг. 17С, а средние групповые фармакокинетические параметры представлены в табл. 15. Системная экспозиция дуотелу CD3xCD20 (исходя из средних значений  $C_{max}$  и  $AUC_{0-t}$ ) возрастала с повышением дозы и у самцов, и у самок. Исходя из

нормированных по дозе значений, системная экспозиция к дуотелу CD3xCD20 обычно повышалась пропорционально дозе от 0,1 до 1 мг/кг и более чем пропорционально дозе от 1 до 10 мг/кг и у самцов, и у самок, тогда как нормированные по дозе значения  $AUC_{0-t}$  возрастали более чем пропорционально дозе от 0,1 до 10 мг/кг. В целом повышение было более чем пропорционально дозе от 0,1 до 10 мг/кг у самцов и самок после подкожного введения. Медианное значение  $T_{max}$  обычно составляло 72 часа у самцов, а у самок не отмечалось устойчивых тенденций  $T_{max}$  во всем диапазоне доз вследствие большей вариабельности индивидуальных значений  $T_{max}$ .  $T_{1/2}$  был наибольшим при высокой дозе, когда фаза элиминации была выражена лучше всего и у самцов, и у самок. Системная экспозиция обычно была выше у самцов, чем у самок при 0,1 мг/кг и была сравнима между самцами и самками при 1 и 10 мг/кг; соотношение  $C_{max}$  и  $AUC_{0-t}$  у самок/самцов при 0,1 мг/кг составляло 0,5 и 0,4, соответственно, 0,8 для обоих параметров при 1 мг/кг и 1,0 для обоих параметров при 10 мг/кг.

**Таблица 15.** Однократная подкожная доза: средние параметры PK дуотела CD3xCD20 в GLP-исследовании по токсикологии

Доза (мг/кг)	$T_{max}$ (ч)	$C_{max}$ (нг/мл)	$AUC_{0-\infty}$ (нг·ч/мл)	$T_{1/2}$ (ч)	F (%)
0,1	72	244 (M)	48300 (M)	86,4 (M)	358 (M)
	4	111 (F)	27400 (F)	43,0 (F)	640 (F)
1	72	2100 (M)	520000 (M)	62,1 (F)	85 (M)
	168	1670 (F)	412000 (F)	55,2	49 (F)
10	72	35900 (M)	9540000 (M)	102 (M)	--
	72	35100 (F)	9620000 (F)	145 (F)	--

M – самцы, F – самки.

Итак, после внутривенного введения дуотела CD3xCD20 концентрации в плазме повышались вплоть до конца 30-минутного периода введения дозы, а затем снижались, как правило, двухфазным образом. После подкожного введения наблюдалось более продолжительное повышение до пика примерно через 72 часа после введения дозы и оставалось на относительно стабильном уровне вплоть до 168 часов после введения дозы. После этого концентрации снижались монофазно вплоть до конца 4-недельного периода отбора проб. При эквивалентных дозах максимальная концентрация в плазме после внутривенного введения была значительно выше, чем максимальная концентрация в плазме после подкожного введения.

### Пример 8

Получали два исходных антитела: IgG1-CD3-FEAL, гуманизованное CD3ε-специфичное антитело IgG1λ с последовательностями тяжелых и легких цепей согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и IgG1-CD20-FEAR с последовательностями

тяжелых и легких цепей согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно, в качестве отдельных биологических промежуточных продуктов. Исходные антитела получали в линиях клеток яичников китайского хомячка (CHO) по единичной технологии культивирования в суспензии и очистки клеток. После этого получали антитело к CD3xCD20 в процессе контролируемого обмена Fab-плечами (сFAE) (Labrijn et al., 2013; Labrijn et al., 2014; Gramer et al., 2013). После доводки/очистки получали конечный продукт с чистотой, близкой к 100%. Концентрации антител измеряли по поглощению при 280 нм, используя теоретический коэффициент экстинкции  $\epsilon = 1,597 \text{ мл}\cdot\text{мг}^{-1}\text{см}^{-1}$ . Полученное биспецифичное антитело получило международное патентованное название – эпкоритамаб.

### Исследование рецептур эпкоритамаба

Далее проводили исследование рецептур для эпкоритамаба. Готовили препараты эпкоритамаба методом замены буфера для каждого состава. После этого каждый препарат стерилизовали фильтрованием и заполняли ими флаконы, которые закрывали крышками с пробками. Исследование включало 31 вариант параметров состава, включая pH (4,8, 5,2, 5,5), концентрации сорбитола (150 мМ, 200 мМ, 250 мМ), концентрации хлорида натрия (0 мМ, 35 мМ, 70 мМ) и концентрации L-аргинина (0 мМ, 35 мМ, 70 мМ), при этом концентрация эпкоритамаба 60 мг/мл и концентрация полисорбата 80 (PS80) 0,04% (мас./об.) не менялись. Исследуемые составы приведены в табл. 16. Также проводили дополнительный анализ пяти (5) отобранных рецептур при концентрации эпкоритамаба 48 мг/мл (данные не приводятся).

**Таблица 16.** Исследуемые составы при исследовании рецептур эпкоритамаба

Рецептура	API, мг/мл	pH	Ацетат, мМ	Сорбитол, мМ	Аргинин, мМ	Хлорид натрия, мМ	PS80, %
1	60	5,2	30	250	0	35	0,04
2	60	5,5	30	150	35	35	0,04
3	60	5,2	30	200	35	35	0,04
4	60	5,5	30	200	35	70	0,04
5	60	5,2	30	200	0	0	0,04
6	60	5,5	30	200	70	35	0,04
7	60	5,2	30	200	35	35	0,04
8	60	5,2	30	250	35	70	0,04
9	60	5,2	30	200	35	35	0,04
10	60	5,2	30	150	35	70	0,04
11	60	5,5	30	250	35	35	0,04
12	60	4,8	30	200	70	35	0,04
13	60	4,8	30	200	0	35	0,04
14	60	5,2	30	150	70	35	0,04
15	60	5,2	30	200	70	70	0,04
16	60	4,8	30	200	35	70	0,04
17	60	4,8	30	250	35	35	0,04

18	60	4,8	30	200	35	0	0,04
19	60	5,2	30	200	35	35	0,04
20	60	4,8	30	150	35	35	0,04
21	60	5,2	30	150	0	35	0,04
22	60	5,2	30	250	35	0	0,04
23	60	5,2	30	250	70	35	0,04
24	60	5,2	30	150	35	0	0,04
25	60	5,2	30	200	0	70	0,04
26	60	5,5	30	200	0	35	0,04
27	60	5,5	30	200	35	0	0,04
28	60	5,2	30	200	35	35	0,04
29	60	5,2	30	200	70	0	0,04
30	60	5,5	30	150	0	0	0,04
31	60	5,5	30	150	0	0	0,04

Образцы хранили при  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  и при  $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{ RH}$  (относительная влажность), соответственно, вплоть до 8 недель. Отдельные препараты также подвергали циклам замораживания/оттаивания (F/T) или перемешиванию перед анализом. Проведенные аналитические тесты включали внешний вид (цвет, прозрачность и наличие твердых частиц), pH, мутность, содержание белка, DLS, SEC-HPLC, icIEF, восстановительный и невосстановительный CGE-SDS и осмоляльность. Осмоляльность вышеуказанных препаратов составляла от 230 до 530. Все исследованные препараты считались пригодными для подкожного введения людям. Для некоторых составов осмоляльность приведена ниже в табл. 17. Также приводятся результаты по внешнему виду, pH, SEC-HPLC и icIEF. Результаты по другим параметрам испытаний подтверждают выводы для других используемых методов испытаний.

**Таблица 17. Осмоляльность некоторых составов**

Рецептура	API, мг/мл	pH	Ацетат, мМ	Сорбитол, мМ	Аргинин, мМ	Хлорид натрия, мМ	PS80, %	мОсм
F01	60	5,2	30	250	0	35	0,04	335
F05	60	5,2	30	200	0	0	0,04	276
F22	60	5,2	30	250	35	0	0,04	400
F27	60	5,5	30	200	35	0	0,04	342
F31	60	5,5	30	150	0	0	0,04	233

#### Результаты по внешнему виду

Все исследованные препараты представляли собой желтоватые, прозрачные жидкости или слегка опалесцирующие жидкости и не содержали видимых частиц. Не наблюдалось никаких изменений при хранении вплоть до 8 недель. В табл. 18 представлены результаты для отдельных рецептов, в которых был изменен уровень аргинина и сорбитола.

Таблица 18. Результаты по внешнему виду

Образец			Состав препарата					Внешний вид		
ещ.	Условия	pH	Ацетат мМ	Сорбитол мМ	Аргинин мМ	Хлорид Na, мМ	PS80, %	Цвет	Прозрачность	Частицы
05	T <sub>0</sub>	5,2	30	200	0	0	0,04	SY	SO	нет
	контроль 5°C, 8 нед.							SY	SO	нет
	5x F/T							SY	SO	нет
	перемешивание 48 ч							SY	CL	нет
	40°C, 8 нед.							SY	SO	нет
22	T <sub>0</sub>	5,2	30	250	35	0	0,04	SY	SO	нет
	контроль 5°C, 8 нед.							SY	SO	нет
	5x F/T							SY	SO	нет
	перемешивание 48 ч							SY	CL	нет
	40°C, 8 нед.							SY	SO	нет
F27	T <sub>0</sub>	5,5	30	200	35	0	0,04	SY	SO	нет
	контроль 5°C, 8 нед.							SY	SO	нет
	5x F/T							SY	SO	нет
	40°C, 8 нед.							SY	SO	нет
F31	T <sub>0</sub>	5,5	30	150	0	0	0,04	SY	SO	нет
	контроль 5°C, 8 нед.							SY	SO	нет
	5x F/T							SY	SO	нет
	перемешивание 48 ч							SY	CL	нет
	40°C, 8 нед.							SY	SO	нет

Рец. (рецептура); F/T (замораживание/оттаивание); SY (желтоватая), SO (слегка опалесцирующая), CL (прозрачная жидкость); нет (нет видимых частиц).

### Результаты по pH

Все исследованные препараты имели целевые значения pH или были близки к ним. Не наблюдалось никаких изменений при хранении вплоть до 8 недель. В табл. 19 приведены результаты для всех образцов, хранившихся при 40°C вплоть до 8 недель.

Таблица 19. Результаты по pH для образцов, хранившихся до 8 недель при 40°C.

Образец		Состав препарата			pH			
Рецептура	pH	Сорбитол, мМ	Аргинин, мМ	Хлорид Na, мМ	T <sub>0</sub>	3 нед.	6 нед.	8 нед.
F01	5,2	250	0	35	5,3	5,3	5,4	5,4
F02	5,5	150	35	35	5,6	5,6	5,6	5,6
F03	5,2	200	35	35	5,3	5,3	5,3	5,3
F04	5,5	200	35	70	5,6	5,6	5,6	5,6
F05	5,2	200	0	0	5,4	5,4	5,4	5,4
F06	5,5	200	70	35	5,6	5,6	5,6	5,6
F07	5,2	200	35	35	5,3	5,3	5,3	5,3
F08	5,2	250	35	70	5,3	5,3	5,3	5,3
F09	5,2	200	35	35	5,3	5,3	5,3	5,3
F10	5,2	150	35	70	5,3	5,3	5,3	5,3
F11	5,5	250	35	35	5,6	5,6	5,6	5,6

F12	4,8	200	70	35	4,9	4,9	4,9	4,9
F13	4,8	200	0	35	4,9	4,9	4,9	4,9
F14	5,2	150	70	35	5,3	5,3	5,3	5,3
F15	5,2	200	70	70	5,1	5,1	5,1	5,1
F16	4,8	200	35	70	4,9	4,9	4,9	4,9
F17	4,8	250	35	35	4,9	4,9	4,9	4,9
F18	4,8	200	35	0	5,0	5,0	5,0	5,0
F19	5,2	200	35	35	5,3	5,3	5,3	5,3
F20	4,8	150	35	35	4,9	4,9	5,0	4,9
F21	5,2	150	0	35	5,3	5,4	5,4	5,3
F22	5,2	250	35	0	5,3	5,4	5,4	5,3
F23	5,2	250	70	35	5,3	5,4	5,3	5,3
F24	5,2	150	35	0	5,4	5,4	5,4	5,4
F25	5,2	200	0	70	5,3	5,3	5,3	5,3
F26	5,5	200	0	35	5,6	5,6	5,6	5,6
F27	5,5	200	35	0	5,7	5,7	5,7	5,6
F28	5,2	200	35	35	5,3	5,3	5,4	5,3
F29	5,2	200	70	0	5,4	5,4	5,4	5,4
F30	5,5	150	0	0	5,7	5,7	5,7	5,7
F31	5,5	150	0	0	5,7	5,7	5,7	5,7
F32	5,5	150	0	0	5,7	5,7	5,7	5,7
F33	5,5	200	0	0	5,7	5,7	5,7	5,7
F34	5,5	250	0	0	5,7	5,7	5,7	5,7
F35	5,5	150	0	35	5,6	5,6	5,6	5,6
F36	5,5	150	35	0	5,6	5,7	5,7	5,6

### Результаты по HPLC-SEC

Во всех образцах наблюдалось снижение содержания мономера и повышение высокомолекулярных (HMW) частиц после хранения при 40°C вплоть до 8 недель. В табл. 20 представлены результаты по HPLC-SEC для отдельных рецептур, в которых был изменен уровень аргинина и сорбитола. Уровень сорбитола не оказывал существенного влияния на результаты. Как видно из фиг. 18, повышение уровня NaCl и снижение pH ведет к снижению содержания мономера и повышению HMW.

**Таблица 20.** Результаты по SEC для выбранных рецептур и условий хранения

Образец			Состав препарата					SEC			
Рец.	Условия	pH	Ацетат мМ	Сорбитол мМ	Аргинин мМ	NaCl мМ	PS80 %	% HMW	% мономеров	% LMW	% всех примесей
F05	T <sub>0</sub>	5,2	30	200	0	0	0,04	5,1	94,9	0,1	5,1
	контроль 5°C, 8 нед.							5,6	94,3	0,1	5,7
	5x F/T							5,6	94,3	0,1	5,7
	перемешивание 48 ч 40°C, 8 нед.							5,7	94,2	0,1	5,8
F22	T <sub>0</sub>	5,2	30	250	35	0	0,04	10,4	88,0	1,6	12,0
	контроль 5°C, 8 нед.							5,0	94,9	0,1	5,1
	5x F/T							5,6	94,4	0,1	5,6
	перемешивание 48 ч 40°C, 8 нед.							5,6	94,3	0,1	5,7
								5,5	94,4	0,1	5,6
	11,2	86,9	1,8	13,1							

F27	T <sub>0</sub>	5,5	30	200	35	0	0,04	5,2	94,7	0,1	5,3
	контроль 5°C, 8 нед.							5,9	94,0	0,1	6,0
	5x F/T							5,9	94,0	0,1	6,0
	40°C, 8 нед.							11,2	87,3	1,5	12,7
F31	T <sub>0</sub>	5,5	30	150	0	0	0,04	5,8	94,1	0,1	5,9
	контроль 5°C, 8 нед.							6,5	93,4	0,1	6,6
	5x F/T							6,5	93,4	0,1	6,6
	перемешив ание 48 ч							6,5	93,4	0,1	6,6
	40°C, 8 нед.							11,3	87,4	1,3	12,6

### Результаты по icIEF

Как и ожидалось, во всех образцах наблюдалось снижение основного пика и повышение кислых вариантов после хранения при 40°C вплоть до 8 недель. В табл.21 представлены результаты по icIEF для отдельных рецептур, в которых был изменен уровень аргинина и сорбитола. Уровень сорбитола не оказывал существенного влияния на результаты. Уровень аргинина может оказывать небольшое положительное влияние на кислые варианты.

**Таблица 21.** Результаты по icIEF для выбранных рецептур и условий хранения

Образец			Состав препарата					icIEF			
Рец.	Условия	pH	Ацетат мМ	Сорбитол мМ	Аргинин мМ	NaCl мМ	PS80 %	pI	Основной пик, %	Кислые варианты, %	Щелочные варианты, %
F05	T <sub>0</sub>	5,2	30	200	0	0	0,04	8,62	32,0	65,1	2,9
	контроль 5°C, 8 нед.							8,62	36,4	61,6	2,0
	5x F/T							8,62	33,6	64,3	2,1
	перемешивание 48 ч							8,62	35,9	61,4	2,7
	40°C, 8 нед.							8,63	17,2	79,7	3,0
F22	T <sub>0</sub>	5,2	30	250	35	0	0,04	8,63	33,6	63,6	2,9
	контроль 5°C, 8 нед.							8,62	36,2	61,0	2,7
	5x F/T							8,62	34,9	62,2	2,9
	перемешивание 48 ч							8,62	34,2	63,1	2,7
	40°C, 8 нед.							8,63	19,9	76,7	3,4
F27	T <sub>0</sub>	5,5	30	200	35	0	0,04	8,62	33,6	63,5	2,9
	контроль 5°C, 8 нед.							8,62	34,7	63,3	2,0
	5x F/T							8,62	34,9	62,4	2,7
	40°C, 8 нед.							8,63	18,7	79,1	2,2
F31	T <sub>0</sub>	5,5	30	150	0	0	0,04	8,62	33,5	63,8	2,6
	контроль 5°C, 8 нед.							8,63	34,9	62,8	2,3
	5x F/T							8,62	35,0	62,8	2,2
	перемешивание 48 ч							8,62	34,9	62,4	2,8
	40°C, 8 нед.							8,63	16,4	80,9	2,8

### Выводы

Изменение концентрации сорбитола от 150 до 250 мМ не оказывало существенного влияния на профиль стабильности антитела. Снижение рН и добавление хлорида натрия вроде как отрицательно сказываются на профиле стабильности антитела.

Таким образом, исходя из данных этого эксперимента, предусматривается рецептура для антитела, включающая сорбитол в диапазоне 150-250 мМ и содержащая 30 мМ ацетата, 0,04% полисорбата 80 и рН в пределах 5,3-5,5. Например, рецептура, содержащая 250 мМ сорбитола, 30 мМ ацетата, 0,04% полисорбата 80 и рН в пределах 5,3-5,5. Кроме того, оказывается, что в рецептуру можно включать и небольшие количества других наполнителей, например, аргинина (напр., вплоть до 58 мМ), не оказывающих отрицательных эффектов в отношении препарата.

Итак, полученные результаты подтверждают, что рецептура из 30 мМ ацетата, 150 мМ сорбитола, 0,04% полисорбата 80, рН 5,5 является оптимальной в диапазоне концентраций эпкоритамаба до 60 мг/мл включительно. Необязательно предусматривается включение дополнительного количества наполнителей для повышения осмоляльности до более физиологического уровня.

### **Пример 9. Разбавители**

Для приготовления разведений использовали фармацевтическую композицию эпкоритамаба в 5 мг/мл.

Исследования совместимости показали, что разбавитель для конкретного препарата можно использовать для разведения вплоть до 5 мкг/мл.

Также испытывали коммерческий разбавитель, т.е. 0,9% NaCl мас./об. в воде для инъекций. Было показано, что этот коммерческий разбавитель совместим с разбавлением вплоть до 80 мкг/мл.

Испытания включали хранение вплоть до 24 часов. Данные показали, что это не влияет на содержание или профиль стабильности в условиях испытаний.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Фармацевтическая композиция, содержащая или состоящая в основном из:

a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела, связывающегося с CD3 человека и с CD20 человека,

b) 20-40 mM ацетата,

c) 140-260 mM сорбитола,

d) поверхностно-активного вещества,

причем значение pH композиции составляет от 5 до 6, а биспецифичное антитело содержит первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, при этом [с] составляет 140-160 mM сорбитола.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, при этом первая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD3, содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , которые по последовательности по меньшей мере на 90% идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, при этом вторая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD20, содержит последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , которые по последовательности по меньшей мере на 90%

идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентичны последовательностям  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, при этом биспецифичное антитело представляет собой антитело IgG1.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, при этом биспецифичное антитело содержит первую и вторую легкую цепь, которые включают первую и вторую константные области легкой цепи, выбранные из константной области легкой цепи лямбда и константной области легкой цепи каппа, например, константных областей легкой цепи согласно SEQ ID NO: 22 и 23.

7. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом биспецифичное антитело содержит Fc-область, которая включает первую и вторую тяжелую цепь, причем данная Fc-область была модифицирована так, чтобы её эффекторные функции были снижены по сравнению с биспецифичным антителом, содержащим Fc-область IgG1 дикого типа.

8. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом биспецифичное антитело содержит Fc-область, которая была модифицирована так, чтобы связывание C1q с данным антителом снижалось по сравнению с биспецифичным антителом, содержащим Fc-область IgG1 дикого типа, по меньшей мере на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 97% или на 100% при определении связывания C1q методом ELISA.

9. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом биспецифичное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, каждая из которых включает как минимум шарнирную область и области CH2 и CH3, причем в данной первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, а в данной второй тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, причем замены в данной первой и данной второй тяжелых цепях находятся не в одинаковых положениях.

10. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом (i) в первой тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена L, а во второй тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена R, либо (ii) в первой тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой

цепи IgG1 человека, представлена R, а во второй тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлена L.

11. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, находятся F и E, соответственно.

12. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, находятся F, E и A, соответственно.

13. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом в константной области первой тяжелой цепи и в константной области второй тяжелой цепи биспецифичного антитела в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, находятся F, E и A, соответственно, причем в константной области первой тяжелой цепи в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, находится L, а в константной области второй тяжелой цепи в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, находится R.

14. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом константные области первой и второй тяжелой цепи включают аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 16.

15. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом константные области первой и второй тяжелой цепи включают аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 19 и 20, соответственно.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-14, при этом биспецифичное антитело включает связывающее CD3 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-14, при этом биспецифичное антитело представляет собой эпоритамаб или его биоаналог.

18. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом [a] составляет 0,5-120 мг/мл, например, 1,0-60 мг/мл или 5-30 мг/мл, например, 5 мг/мл или 6 мг/мл или 7 мг/мл или 8 мг/мл или 9 мг/мл или 10 мг/мл или 11 мг/мл или 12 мг/мл или 13 мг/мл или 14 мг/мл или 15 мг/мл или 16 мг/мл или 17 мг/мл или 18 мг/мл или 19 мг/мл или 20 мг/мл или 21 мг/мл или 22 мг/мл или 23 мг/мл или 24 мг/мл или 25 мг/мл

или 26 мг/мл или 27 мг/мл или 28 мг/мл или 29 мг/мл, 30 мг/мл, 31 мг/мл, 32 мг/мл, 33 мг/мл, 34 мг/мл, 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл или же 60 мг/мл.

19. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом [b] составляет 25-35 мМ, например, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ, 30 мМ, 31 мМ, 32 мМ, 33 мМ, 34 мМ или 35 мМ, предпочтительно 30 мМ.

20. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом [c] составляет 145-155 мМ, например, 145 мМ, 146 мМ, 147 мМ, 148 мМ, 149 мМ, 150 мМ, 151 мМ, 152 мМ, 153 мМ, 154 мМ, 155 мМ, предпочтительно 150 мМ.

21. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом рН составляет 5,3-5,6 или 5,4-5,6, например, 5,5.

22. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом поверхностно-активное вещество выбрано из группы, включающей глицеринмоноолеат, бензетоний хлорид, докузат натрия, фосфолипиды, полиэтиленалкиловые эфиры, лаурилсульфат натрия и трикаприлин, бензалконий хлорид, цетримид, цетилпиридиний хлорид, фосфолипиды,  $\alpha$ -токоферол, глицерин-моноолеат, миристиловый спирт, фосфолипиды, полочкамеры, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, полиоксиэтиленовые производные касторового масла, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, полиоксиэтиленстеараты, полиоксил-гидроксистеарат, полиоксилглицериды, полисорбаты, пропиленгликольдилаурат, пропиленгликольмонолаурат, сложные сорбитановые эфиры сахарозы и пальмитата, сахарозы и стеарата, трикаприлин и TPGS.

23. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом поверхностно-активным веществом (ПАВ) является полисорбат.

24. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом поверхностно-активным веществом (ПАВ) является полисорбат 20 или 80, например, полисорбат 80.

25. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом ПАВ содержится в концентрации от 0,005% до 0,4% мас./об., например, от 0,01 до 0,1% или от 0,01 до 0,09% или от 0,01 до 0,06% или от 0,01 до 0,05% мас./об., например, 0,02% или 0,03% или 0,04% или 0,05% мас./об., предпочтительно 0,04% мас./об.

26. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция имеет рН 5,3-5,8 или 5,4-5,7, например, 5,5 и содержит или в основном

состоит из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 20-40 мМ ацетата,
- c) 140-260 мМ сорбитола,
- d) 0,005-0,4% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

27. Фармацевтическая композиция по п. 26, при этом [с] составляет 140-160 мМ сорбитола.

28. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция имеет рН 5,4-5,6, например, 5,5 и содержит или в основном состоит из:

- a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- b) 28-32 мМ ацетата,
- c) 145-155 мМ сорбитола,
- d) 0,02-0,05% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

29. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 26-28, при этом [а] составляет 5-60 мг/мл.

30. Фармацевтическая композиция по п. 29, при этом [а] составляет 12-24 мг/мл, например, 12 мг/мл или 24 мг/мл.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-28, при этом [а] составляет 2-8 мг/мл.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-28, при этом [а] составляет 30-90 мг/мл.

33. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-28, при этом [а] составляет 5 мг/мл.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-28, при этом [а] составляет 60 мг/мл.

35. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция имеет рН 5,5 и содержит или состоит из:

- e) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
- f) 30 мМ ацетата,
- g) 150 мМ сорбитола,
- h) 0,04% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.

36. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при

этом композиция имеет рН 5,5 и содержит или состоит из:

- i) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела,
  - j) 30 мМ ацетата,
  - k) 250 мМ сорбитола,
  - l) 0,04% мас./об. ПАВ, предпочтительно полисорбата, например, полисорбата 20 или полисорбата 80, например, полисорбата 80.
37. Фармацевтическая композиция по п. 35 или 36, при этом [а] составляет 2-8 мг/мл.
38. Фармацевтическая композиция по п. 35 или 36, при этом [а] составляет 30-90 мг/мл.
39. Фармацевтическая композиция по п. 35 или 36, при этом [а] составляет 10-50 мг/мл.
40. Фармацевтическая композиция по п. 35 или 36, при этом [а] составляет 12-24 мг/мл, например, 12 мг/мл или 24 мг/мл.
41. Фармацевтическая композиция по п. 35 или 36, при этом [а] составляет 5 мг/мл.
42. Фармацевтическая композиция по п. 35 или 36, при этом [а] составляет 60 мг/мл.
43. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция не содержит гиалуронидазы.
44. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция содержит менее 20 мМ NaCl.
45. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция содержит менее 60 мМ аргинина.
46. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция представляет собой подкожную композицию.
47. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция представляет собой внутривенную композицию.
48. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция предназначена для применения при лечении рака.
49. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция предназначена для применения при подкожном введении.
50. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов 1-45, при этом композиция предназначена для применения при внутривенном введении.
51. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов 1-50, которая находится в единичной дозовой форме.

52. Фармацевтическая композиция по любому из вышеприведенных пунктов, при этом композиция стабильна для фармацевтического применения в течение по меньшей мере 6 месяцев, например, не менее 9 месяцев или 12 месяцев при температуре хранения 2-8°C, например, 5°C.

53. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-46 для подкожного введения.

54. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-45 для внутривенного введения.

55. Применение по п. 53 или 54, при этом применение предназначено для лечения рака.

56. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-52 в течение времени, достаточного для лечения рака.

57. Способ по п. 56, при этом композицию вводят подкожно или внутривенно.

58. Способ по п. 56 или 57, при этом рак представляет собой В-клеточное злокачественное образование.

59. Единичная дозовая форма, содержащая или состоящая из:

а) биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12

в количестве от 5 мкг до 120 мг,

б) ацетатного буфера и сорбитола в соотношении от 1:5 до 1:10, при этом

осмоляльность единичной дозовой формы составляет от 200 до 600 мМ, а рН – от 5,4 до 5,6, и

с) поверхностно-активного вещества.

60. Единичная дозовая форма по п. 59, содержащая или состоящая из:

а) биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12

в количестве от 5 мкг до 120 мг,

б) ацетата в концентрации 30 мМ при рН 5,5,

с) сорбитола в концентрации 150 мМ и

д) 0,04% мас./об. полисорбата 80.

61. Единичная дозовая форма по п. 59, содержащая или состоящая из:

а) биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12

в количестве от 5 мкг до 120 мг,

b) ацетата в концентрации 30 мМ при pH 5,5,

c) сорбитола в концентрации 250 мМ и

d) 0,04% мас./об. полисорбата 80.

62. Единичная дозовая форма по любому из пп. 59-61, при этом первая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD3 человека, включает последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 6 и 7, а вторая область связывания биспецифичного антитела, связывающаяся с CD20 человека, включает последовательности  $V_H$  и  $V_L$  согласно SEQ ID NO: 13 и 14.

63. Единичная дозовая форма по п. 62, при этом биспецифичное антитело содержит константные области первой и второй тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19 и 20, соответственно.

64. Единичная дозовая форма по п. 62, при этом биспецифичное антитело содержит связывающее CD3 плечо, включающее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 26 и 24, соответственно, и связывающее CD20 плечо, включающее тяжелую цепь и легкую цепь согласно SEQ ID NO: 27 и 25, соответственно.

65. Единичная дозовая форма по п. 62, при этом биспецифичное антитело представляет собой эпокоритамаб или его биоаналог.

66. Единичная дозовая форма по любому из пп. 59-65, при этом количество биспецифичного антитела составляет от 40 мкг до 80 мг.

67. Единичная дозовая форма по любому из пп. 59-66, при этом количество биспецифичного антитела составляет от 40 мкг до 60 мг, например, 40 мкг, 50 мкг, 100 мкг, 150, 160 мкг, 170 мкг, 180 мкг, 190 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 350 мкг, 400 мкг, 450 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг, 16 мг, 17 мг, 18 мг, 19 мг, 20 мг, 21 мг, 22 мг, 23 мг, 24 мг, 25 мг, 26 мг, 27 мг, 28 мг, 29 мг, 30 мг, 31 мг, 32 мг, 33 мг, 34 мг, 35 мг, 36 мг, 37 мг, 38 мг, 39 мг, 40 мг, 41 мг, 42 мг, 43 мг, 44 мг, 45 мг, 46 мг, 47 мг, 48 мг, 49 мг, 50 мг, 51 мг, 52 мг, 53 мг, 54 мг, 55 мг, 56 мг, 57 мг, 58 мг, 59 мг или же 60 мг.

68. Единичная дозовая форма по любому из пп. 59-67, при этом общий объем

составляет от 0,5 мл до 2 мл, например, 1 мл.

69. Единичная дозовая форма по п. 68, которая предназначена для подкожного введения.

70. Единичная дозовая форма по п. 69, при этом вводимый объем единичной дозовой формы составляет 1,0 мл или 0,8 мл.

71. Единичная дозовая форма по любому из пп. 59-68, при этом общий объем составляет от 20 мл до 200 мл, а дозовая форма предназначена для внутривенного введения.

72. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту единичной дозовой формы по любому из пп. 59-71 в течение времени, достаточного для лечения рака.

73. Единичная дозовая форма по любому из пп. 59-71 для применения при лечении рака.

74. Контейнер, содержащий единичную дозовую форму по любому из пп. 59-72.

75. Набор, включающий:

- a) фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-52,
- b) ёмкость для единичной дозовой формы,
- c) инструкции по разведению и/или по применению.

76. Набор, включающий:

- a) фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-52,
- b) разбавитель,
- c) ёмкость для единичной дозовой формы,
- d) инструкции по разведению и/или по применению.

77. Набор, включающий:

- a) фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-52,
- b) разбавитель, содержащий ацетат, сорбитол и полисорбат 80,
- c) ёмкость для единичной дозовой формы,
- d) инструкции по разведению и/или по применению.

78. Набор по п. 77, при этом соотношение концентраций ацетата, сорбитола и полисорбата 80 одинаково в разбавителе и фармацевтической композиции.

79. Набор по любому из пп. 75-78, включающий:

- a) фармацевтическую композицию, содержащую:
  - i. 5-60 мг/мл биспецифичного антитела,
  - ii. 30 мМ ацетатного буфера,
  - iii. 150 мМ сорбитола,

- iv. 0,04% мас./об. полисорбата 80,
- v. pH равно 5,5;
  - b) ёмкость для единичной дозовой формы;
  - c) инструкции по разведению и/или по применению.

80. Способ получения фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47, включающий стадии смешивания с водой для инъекций:

a) 0,5-120 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первую область связывания, связывающуюся с CD3 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: SEQ ID NO: 3

VL-CDR1: SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: GTN и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 5,

и вторую область связывания, связывающуюся с CD20 человека, которая включает последовательности CDR:

VH-CDR1: SEQ ID NO: 8

VH-CDR2: SEQ ID NO: 9

VH-CDR3: SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: SEQ ID NO: 11

VL-CDR2: DAS и

VL-CDR3: SEQ ID NO: 12,

- b) 3,53 мг/мл ацетата натрия тригидрата,
  - c) 0,24 мг/мл уксусной кислоты,
  - d) 27,3 мг/мл сорбитола,
  - e) 0,4 мг/мл полисорбата 80,
- и доведение до pH 5,5 добавлением гидроксида натрия.

81. Способ по п. 80, при этом [а] составляет 5 мг/мл.

82. Способ по п. 80, при этом [а] составляет 12 мг/мл.

83. Способ по п. 80, при этом [а] составляет 24 мг/мл.

84. Способ по п. 80, при этом [а] составляет 48 мг/мл.

85. Способ по п. 80, при этом [а] составляет 60 мг/мл.

86. Способ получения единичной дозовой формы по любому из пп. 59-71, включающий стадии:

- a) получение фармацевтической композиции согласно стадиям способа по

любому из пп. 80-85 или обеспечение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-45,

b) получение разбавителя,

c) смешивание фармацевтической композиции и разбавителя до требуемой концентрации биспецифичного антитела.

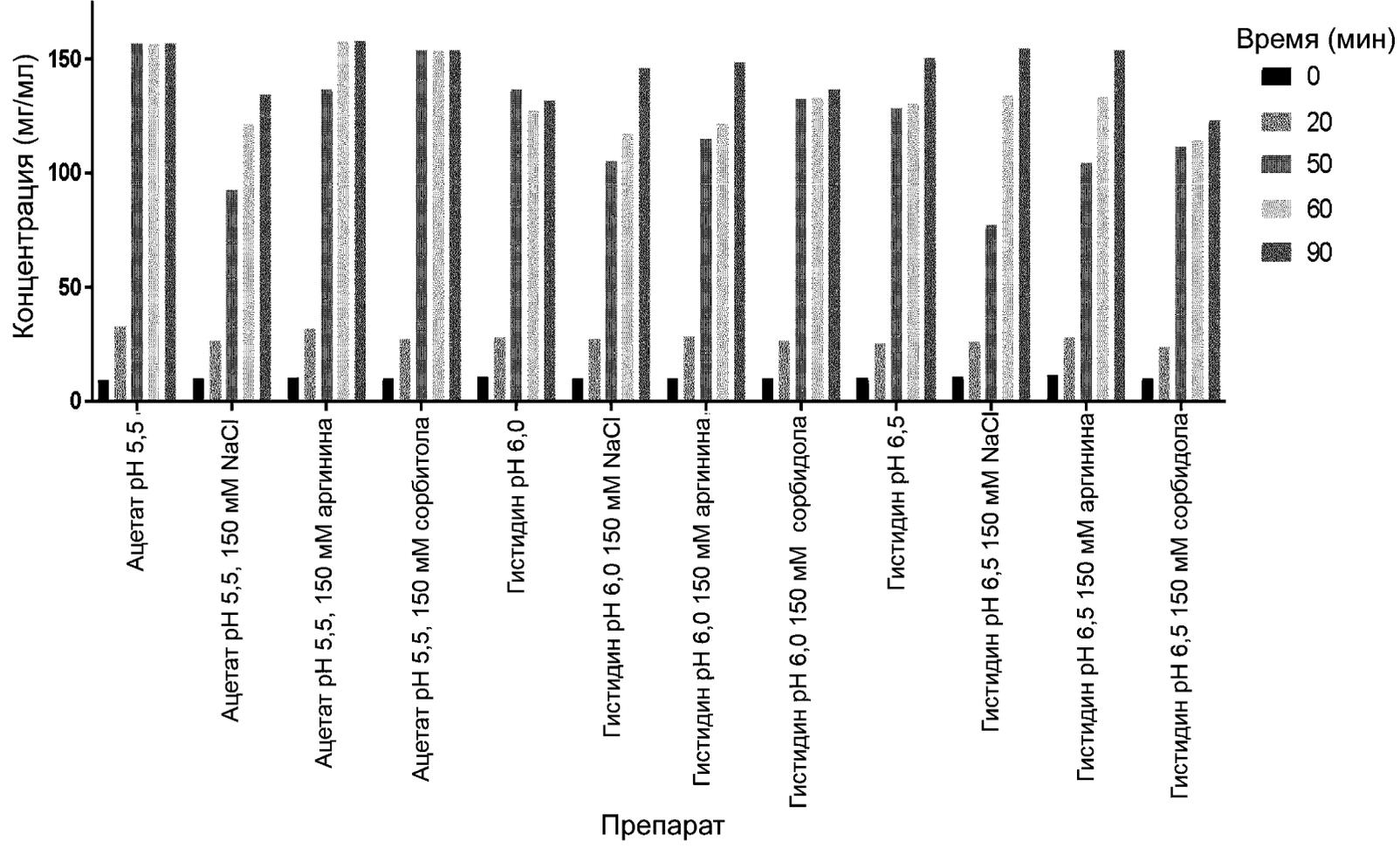
87. Способ получения единичной дозовой формы по любому из пп. 59-71, включающий стадии:

a) получение фармацевтической композиции согласно стадиям способа по любому из пп. 80-85 или обеспечение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-45,

b) получение разбавителя с такими же или близкими концентрациями наполнителей, как у фармацевтической композиции, полученной на стадии (a),

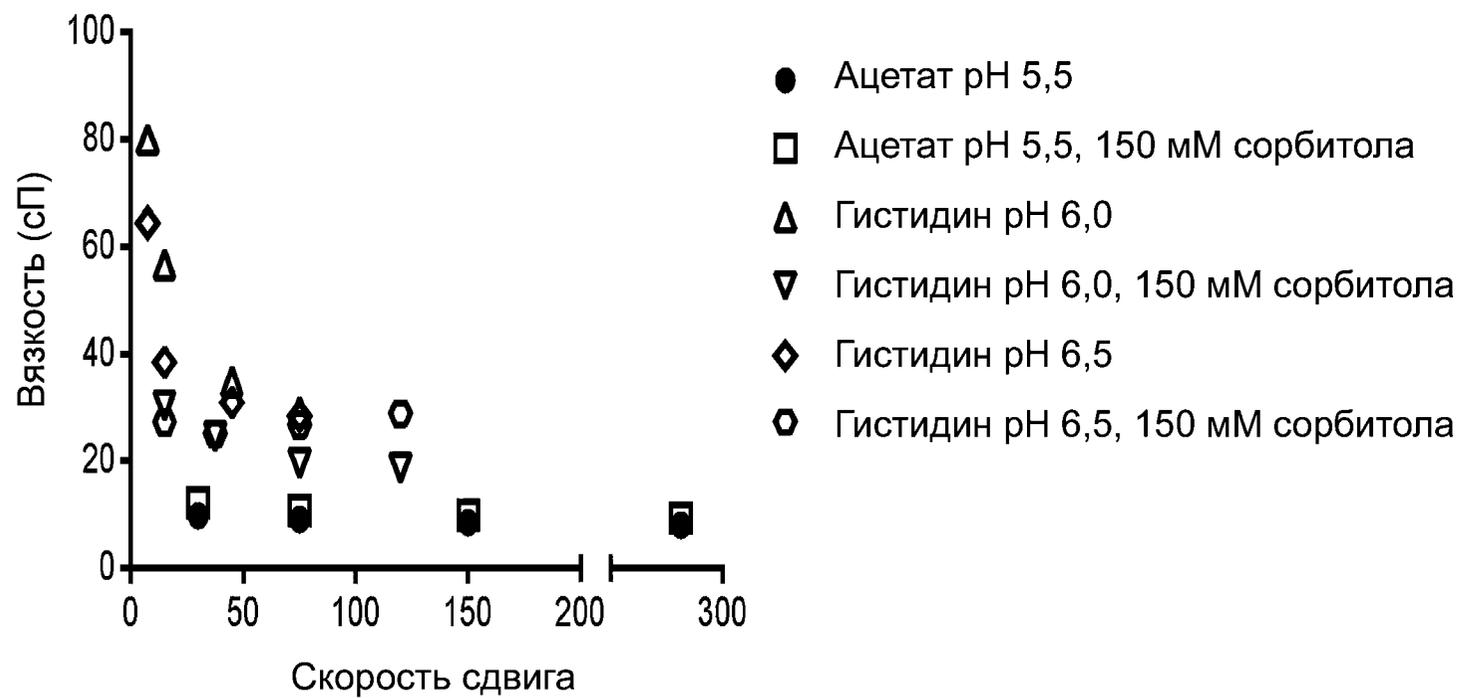
c) смешивание фармацевтической композиции и разбавителя до требуемой концентрации биспецифичного антитела.

88. Фармацевтическая композиция или единичная дозовая форма, которая получена способом по любому из пп. 80-87.

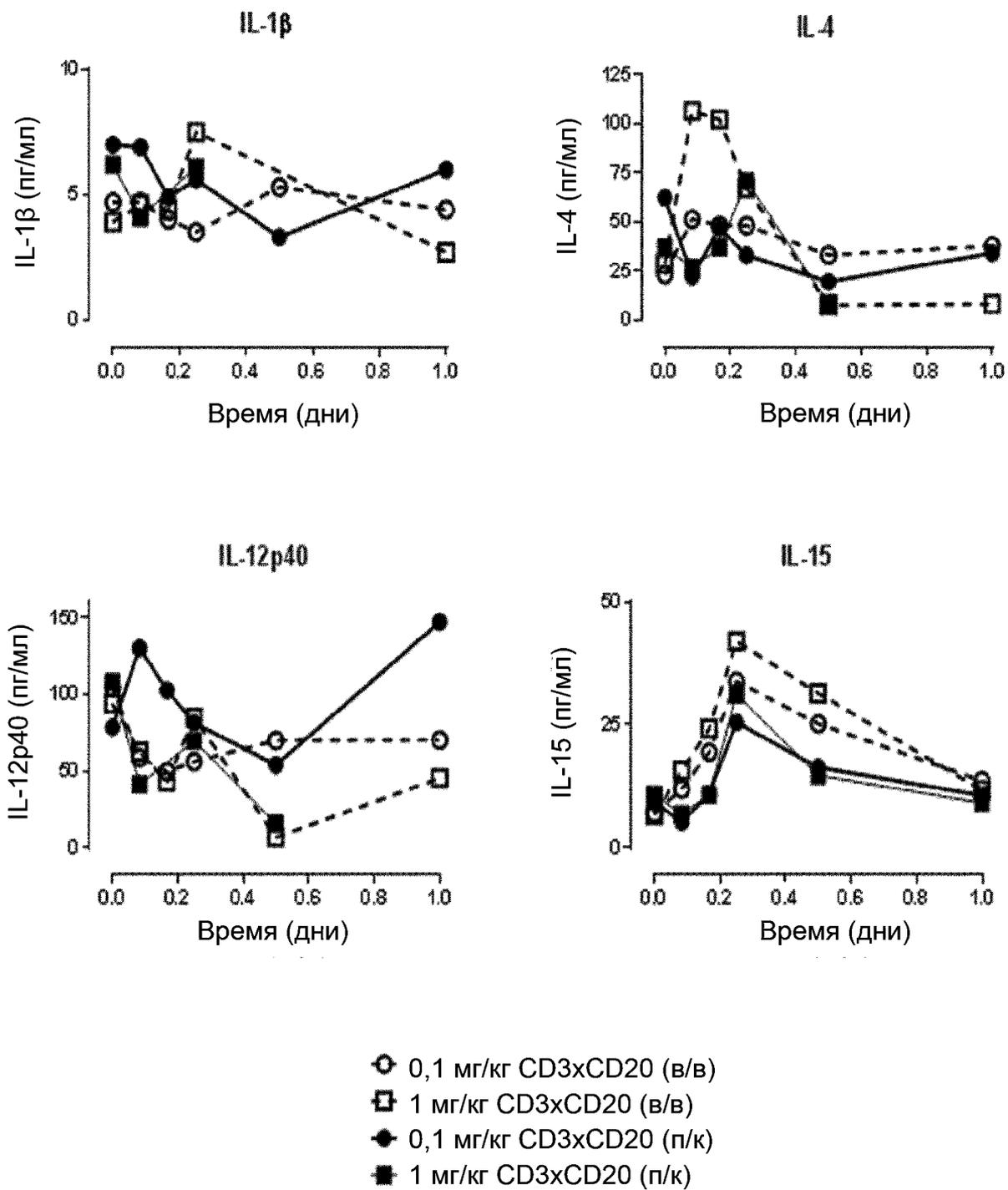


Фиг. 1

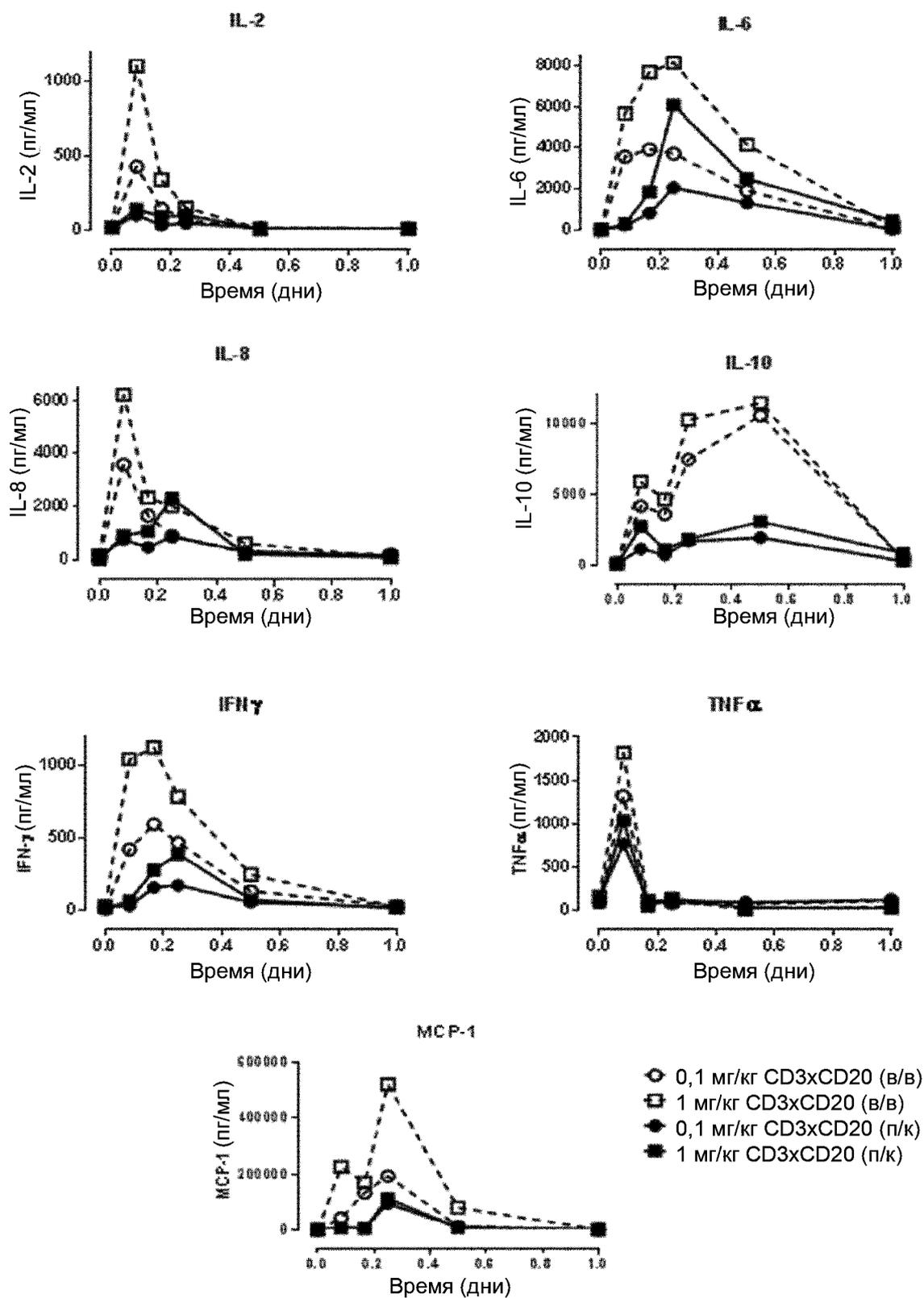
Фиг. 2



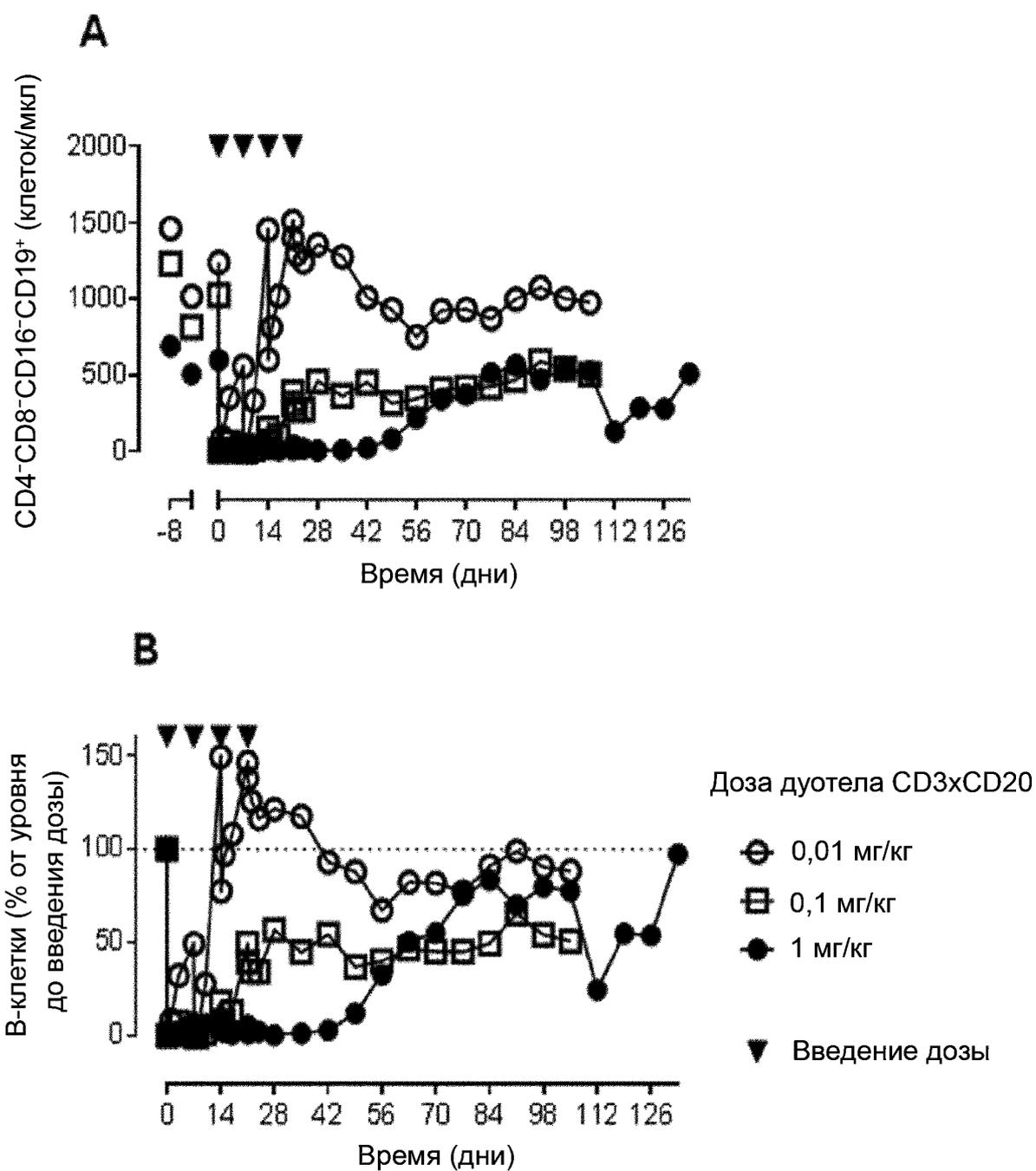
A



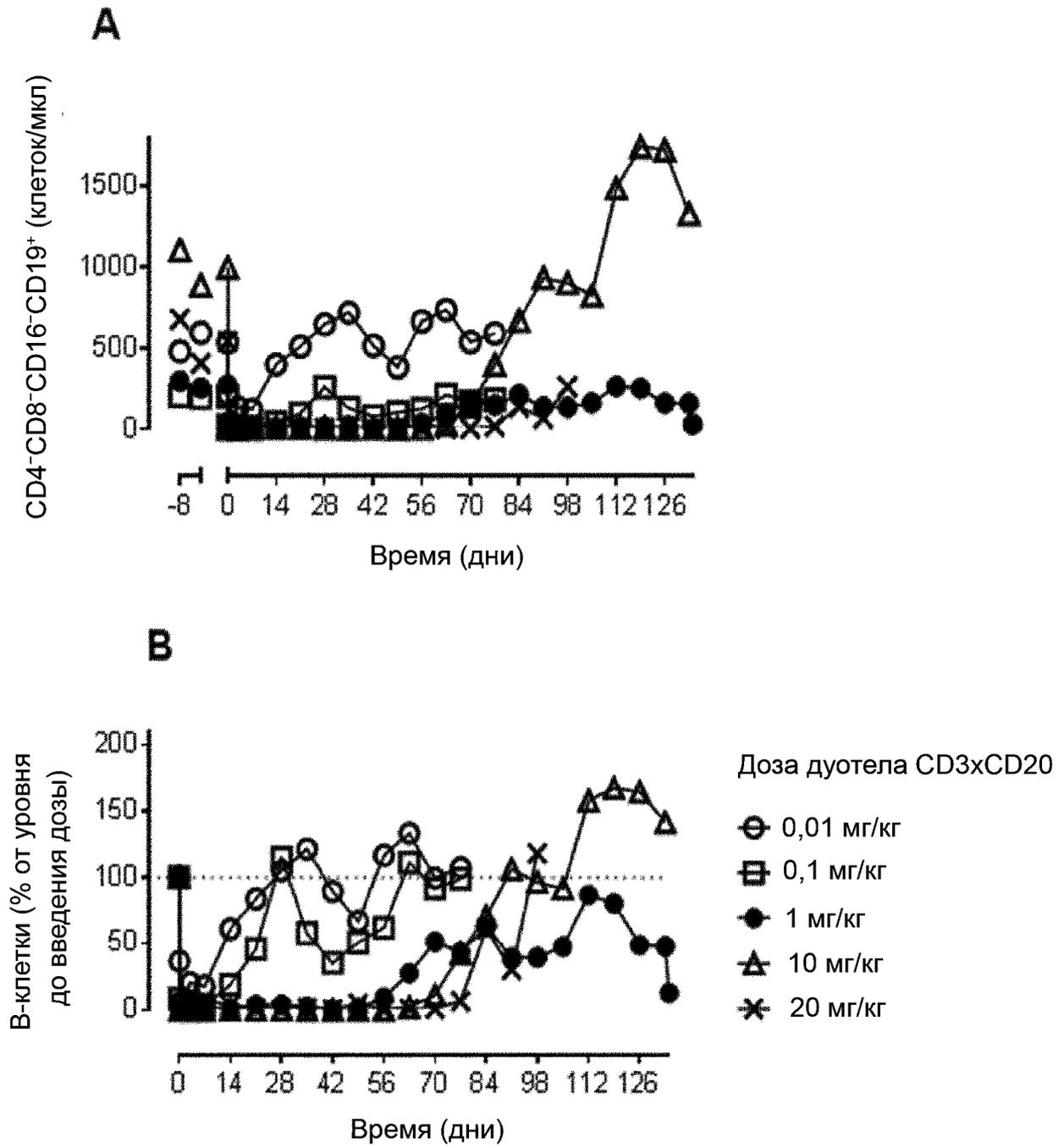
Фиг. 3



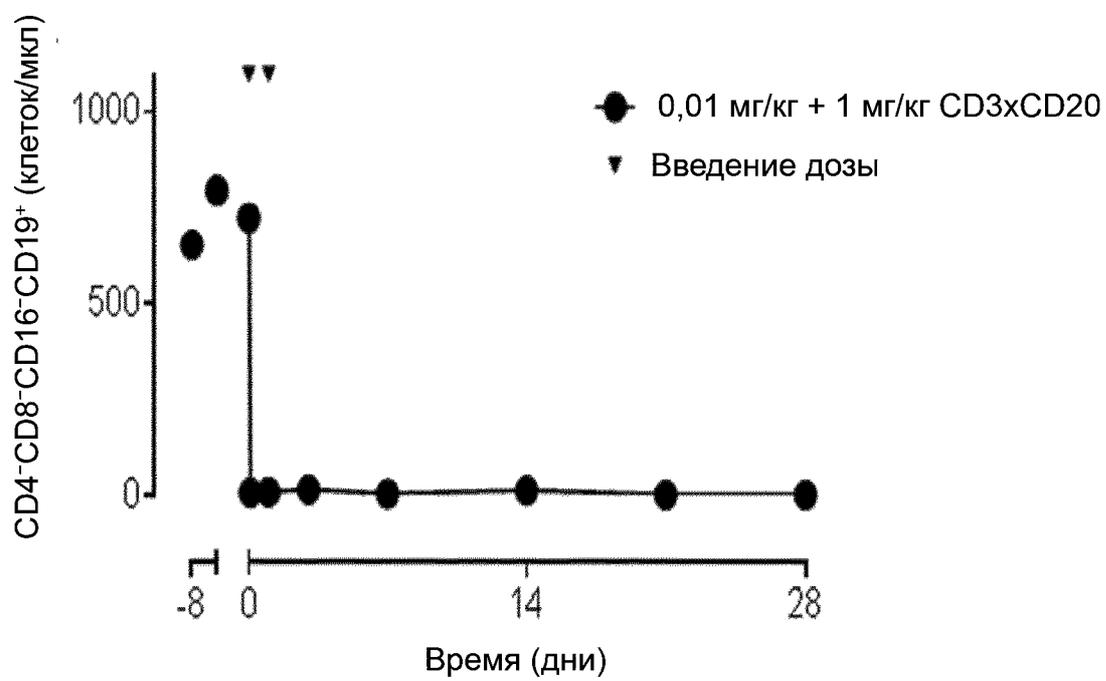
Фиг. 3В



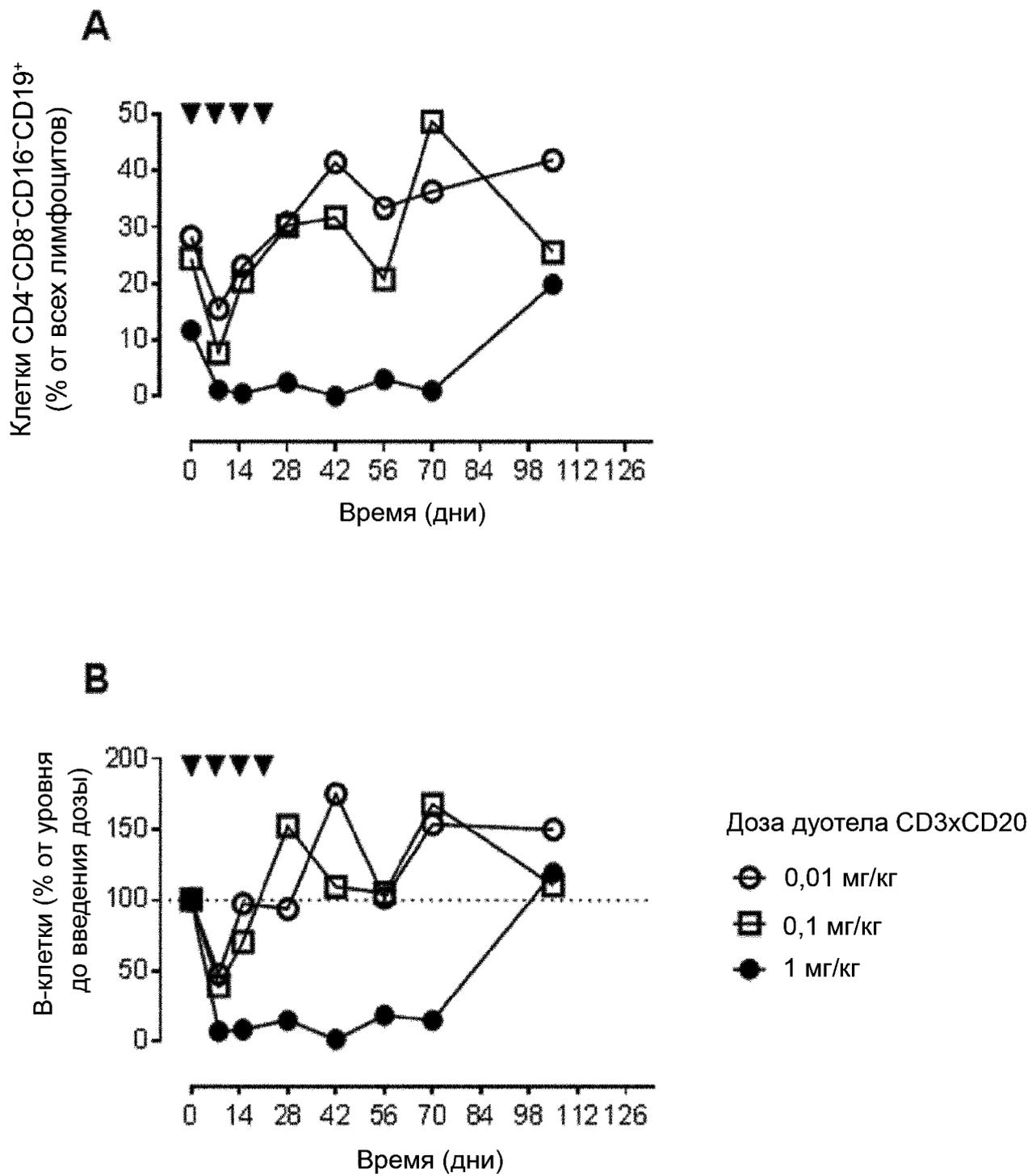
Фиг. 4



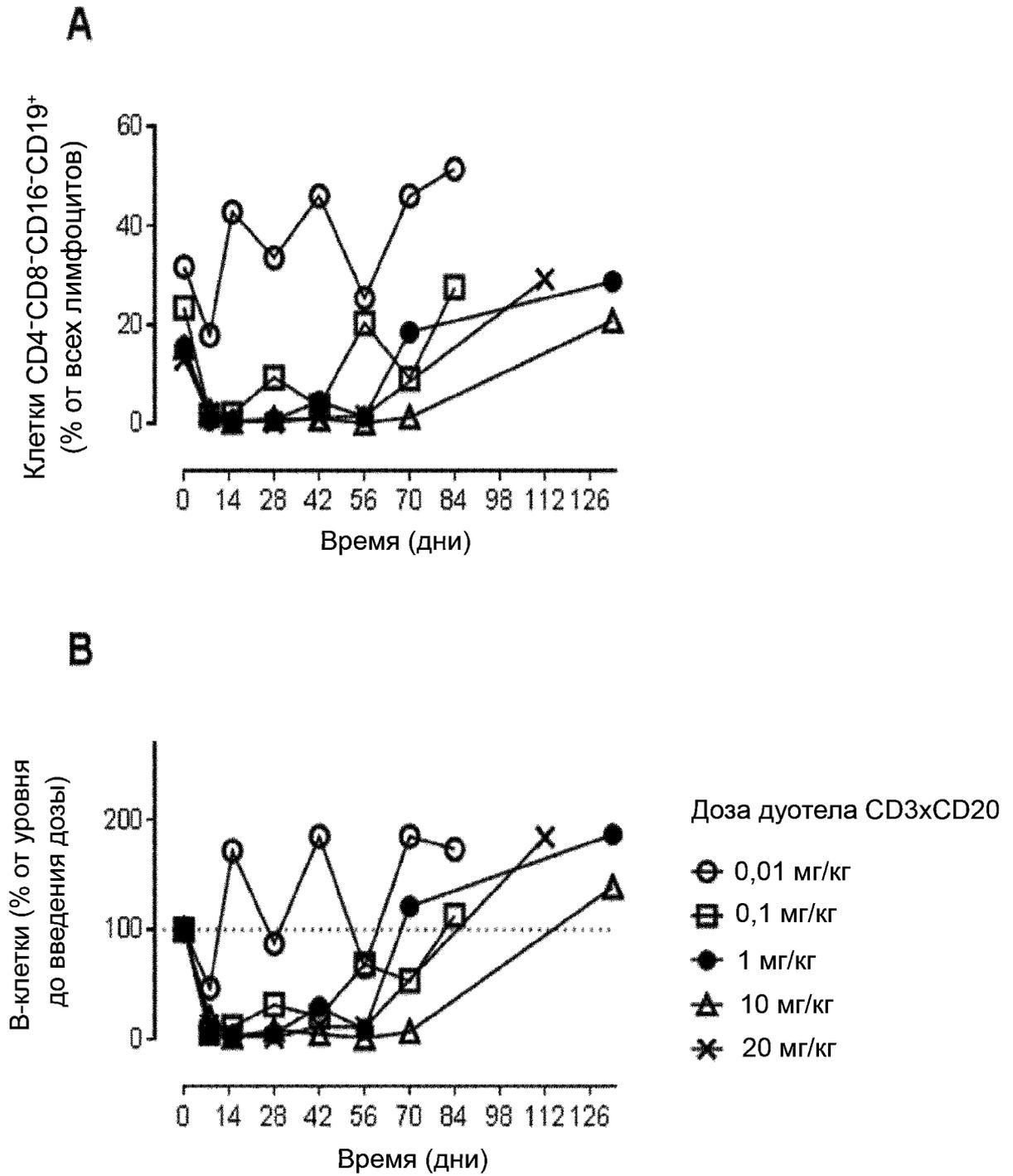
Фиг. 5



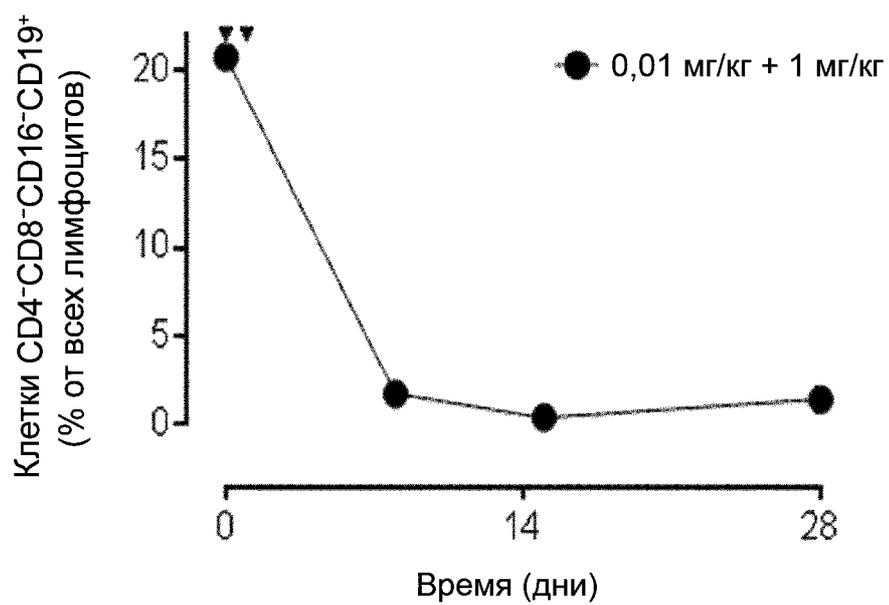
Фиг. 6



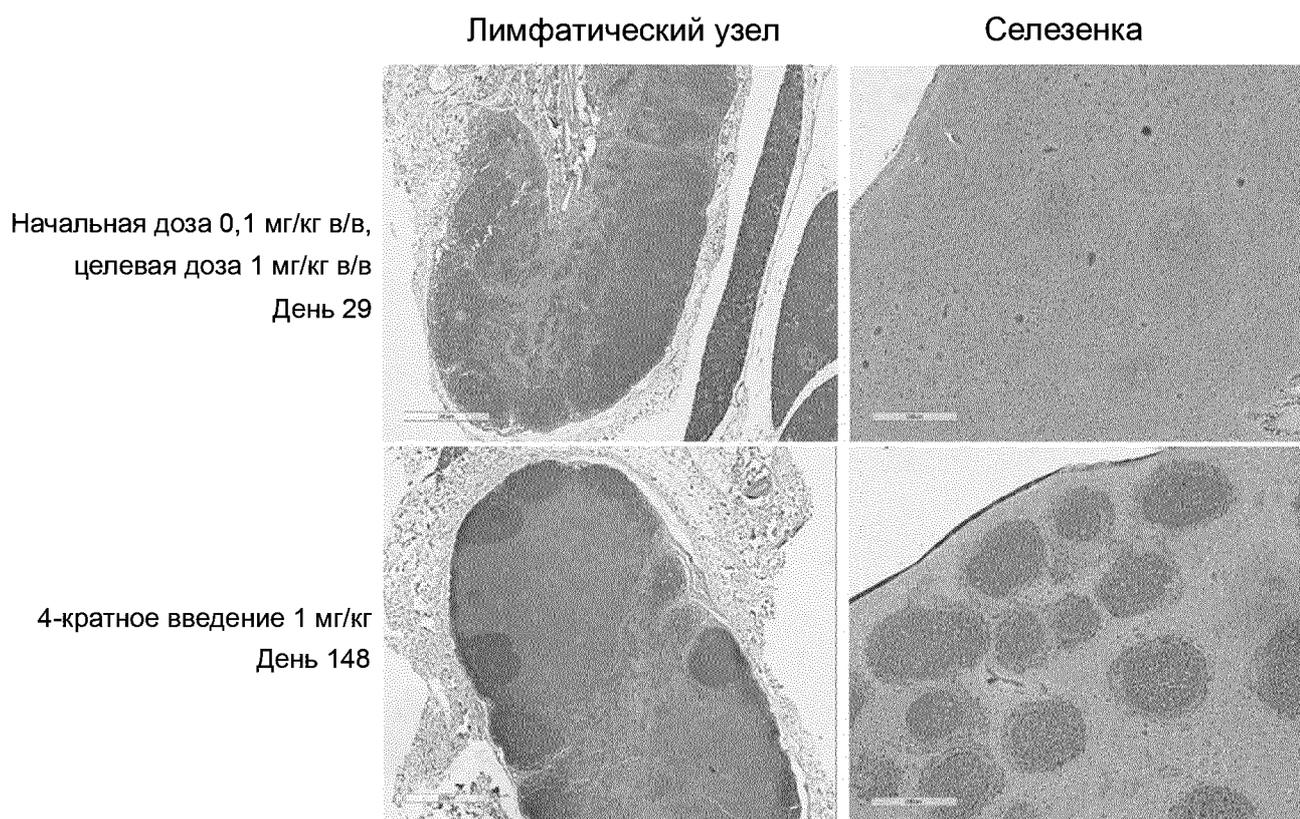
Фиг. 7



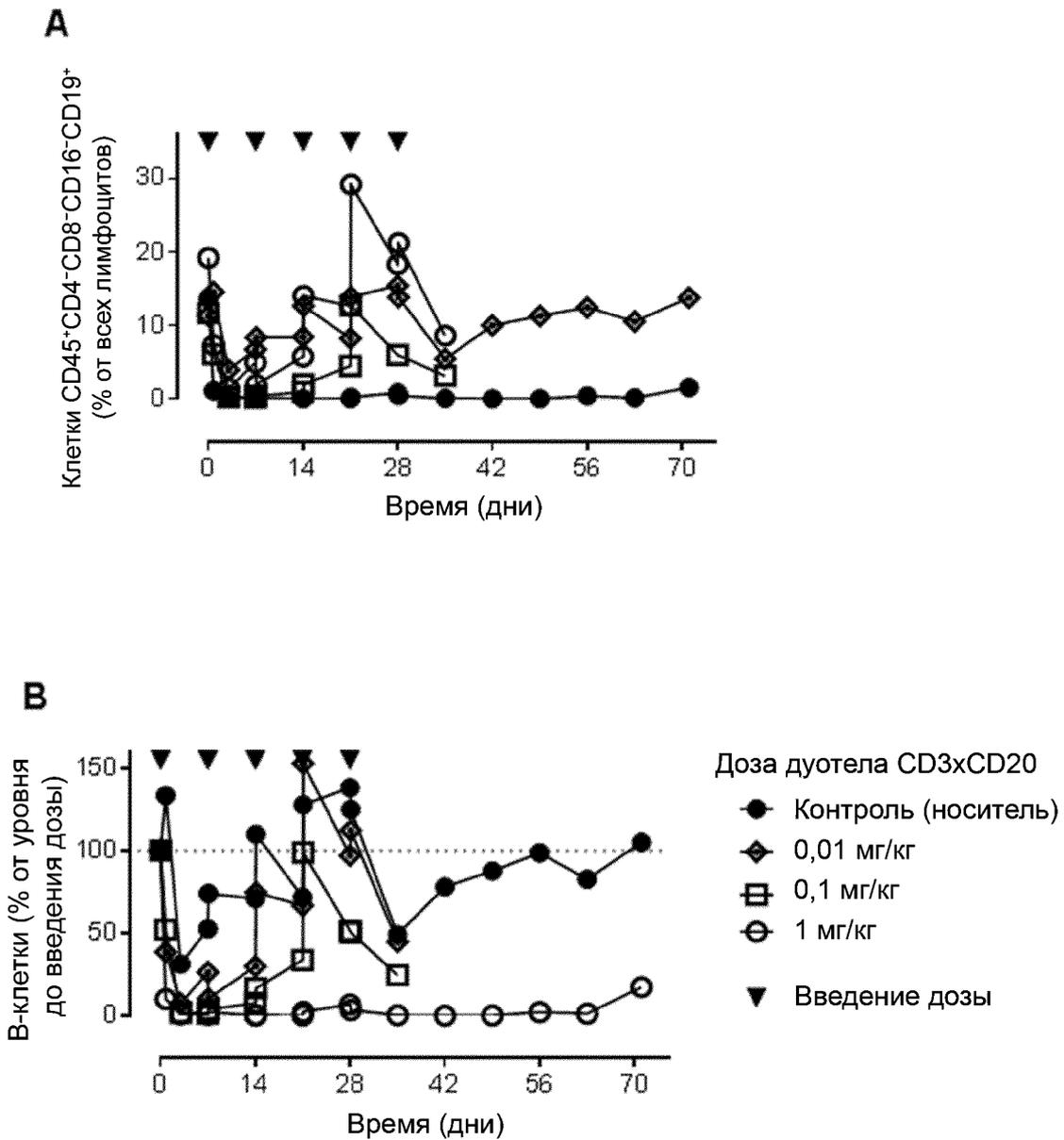
Фиг. 8



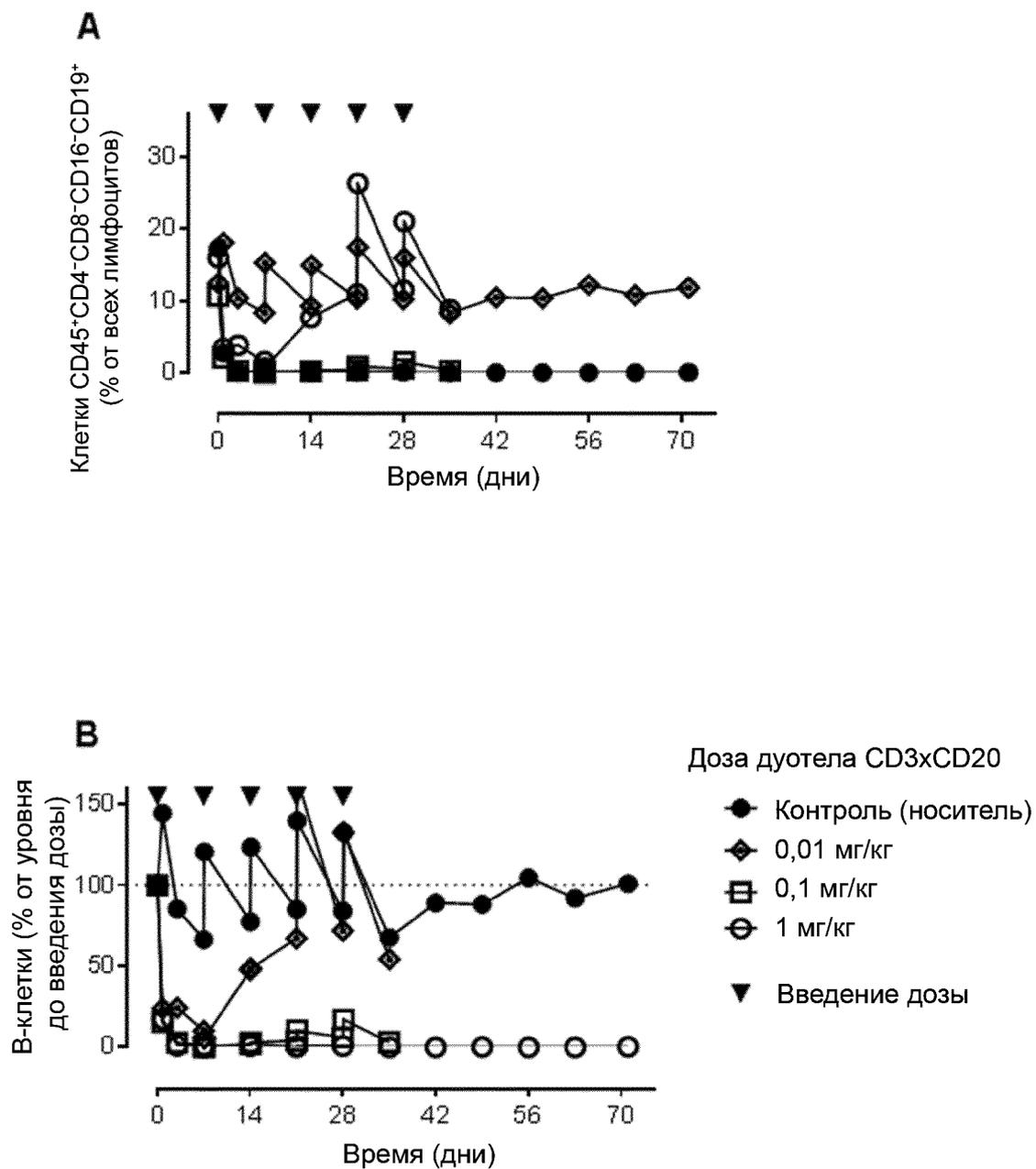
Фиг. 9



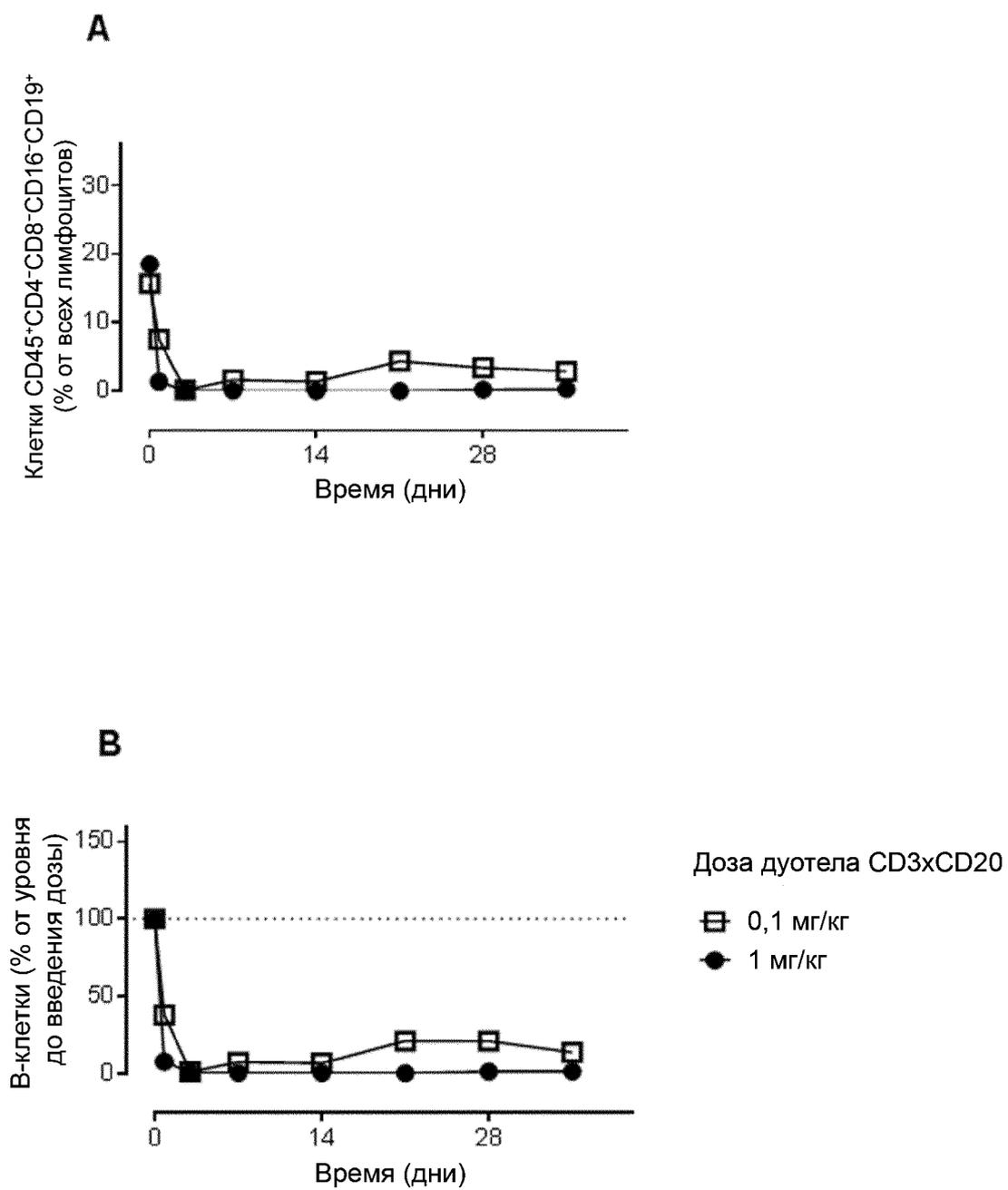
Фиг. 10



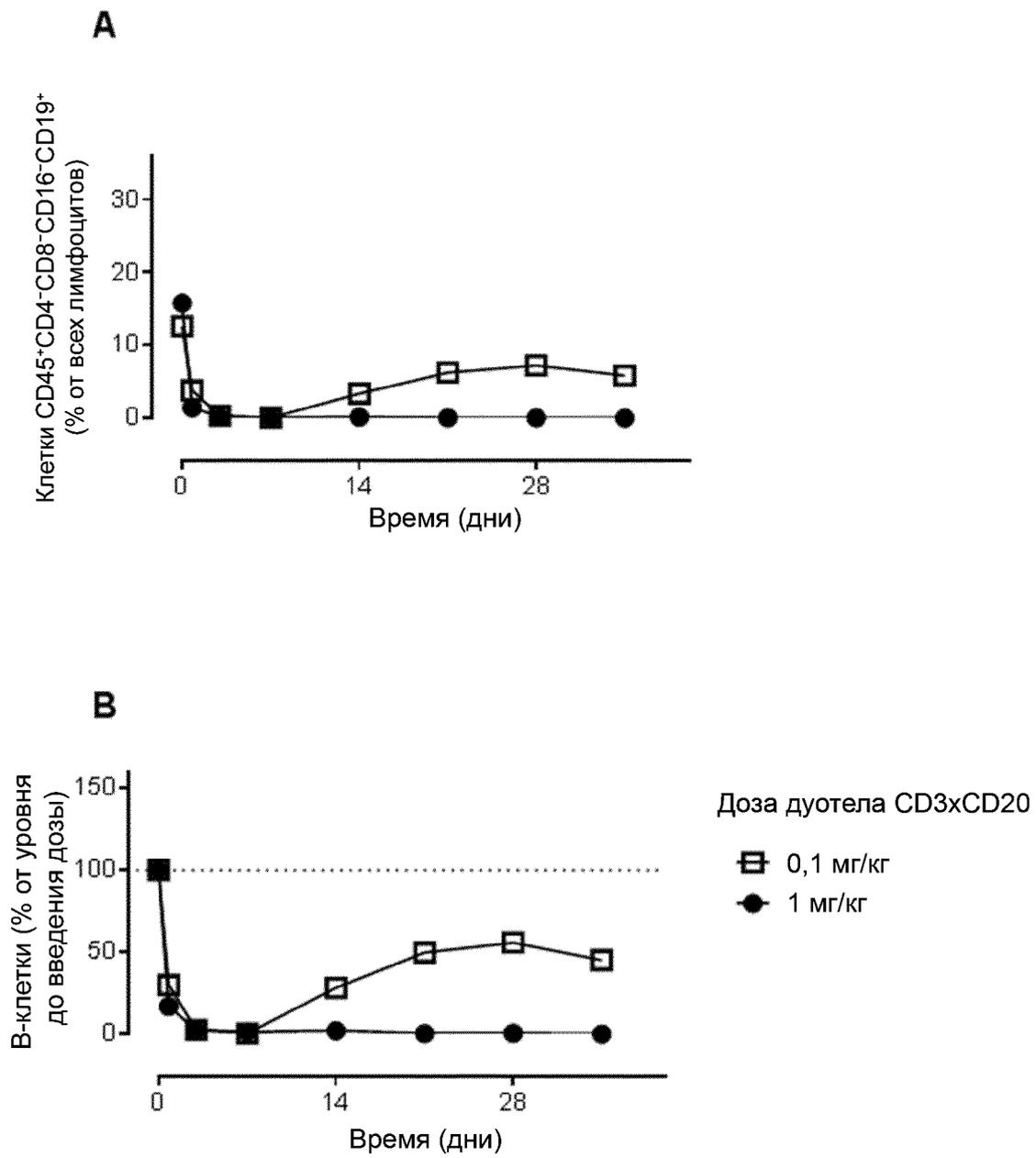
Фиг. 11



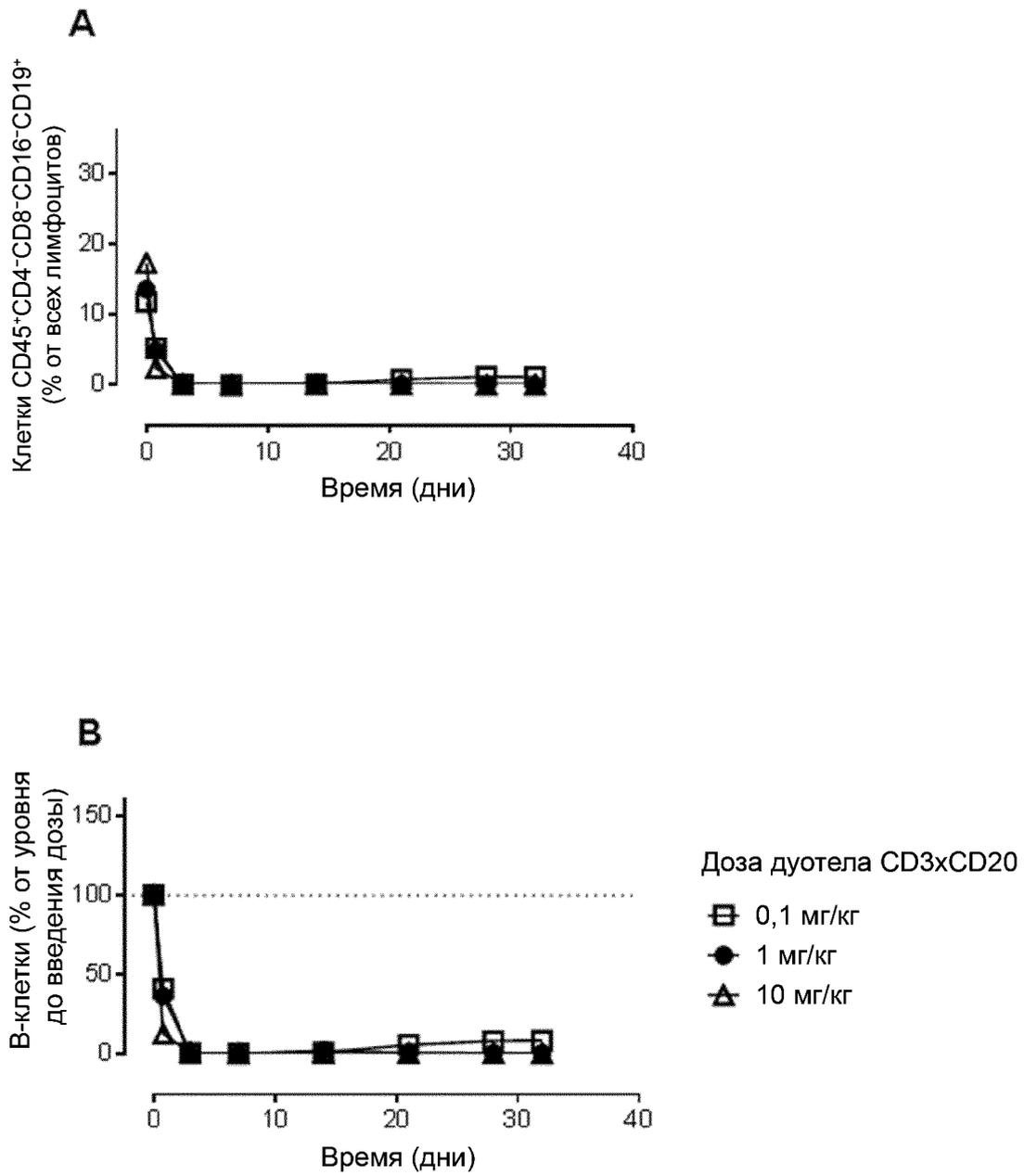
Фиг. 12



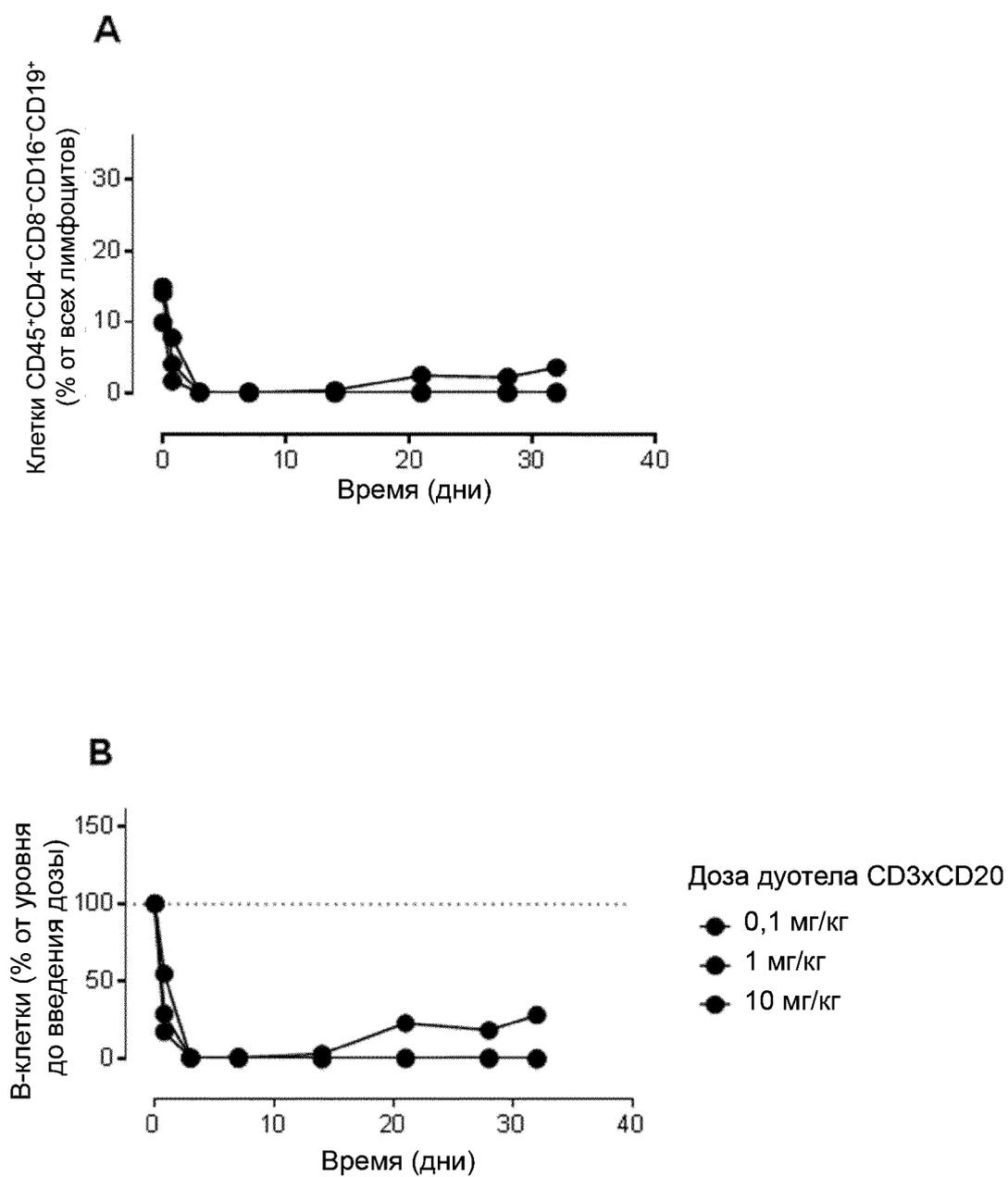
Фиг. 13



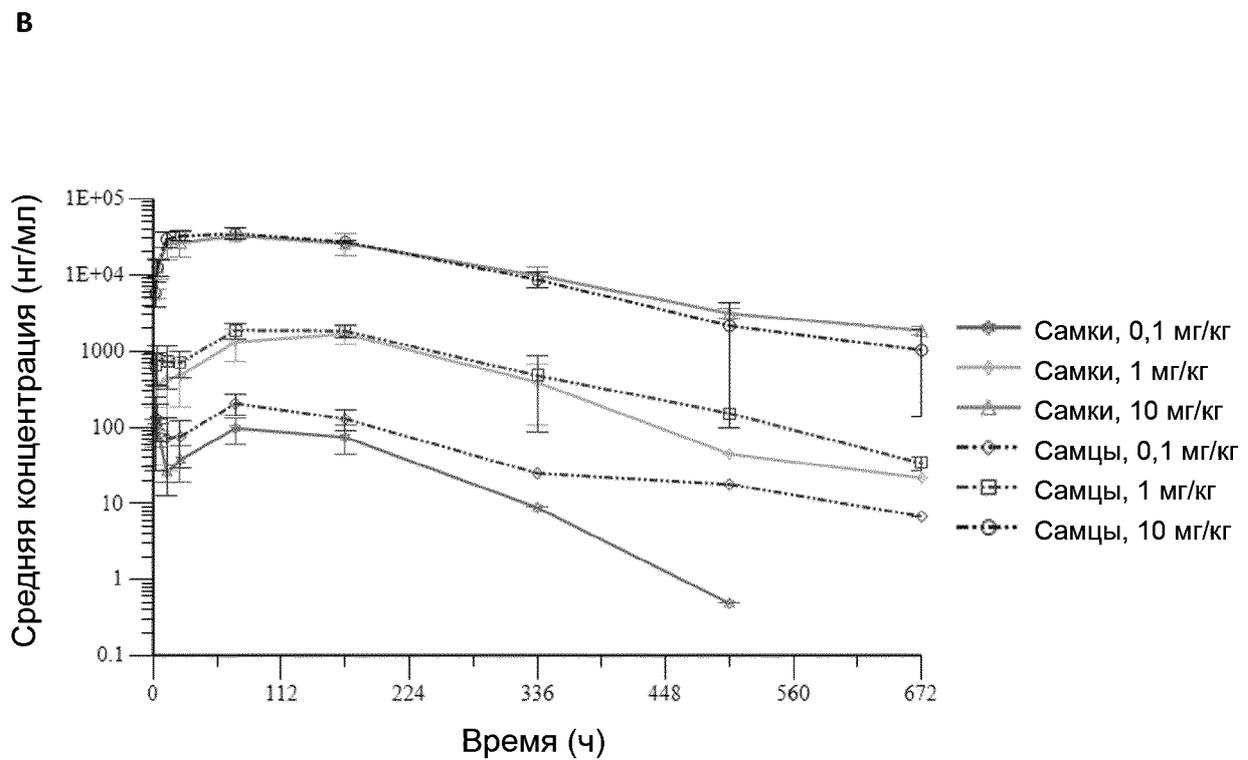
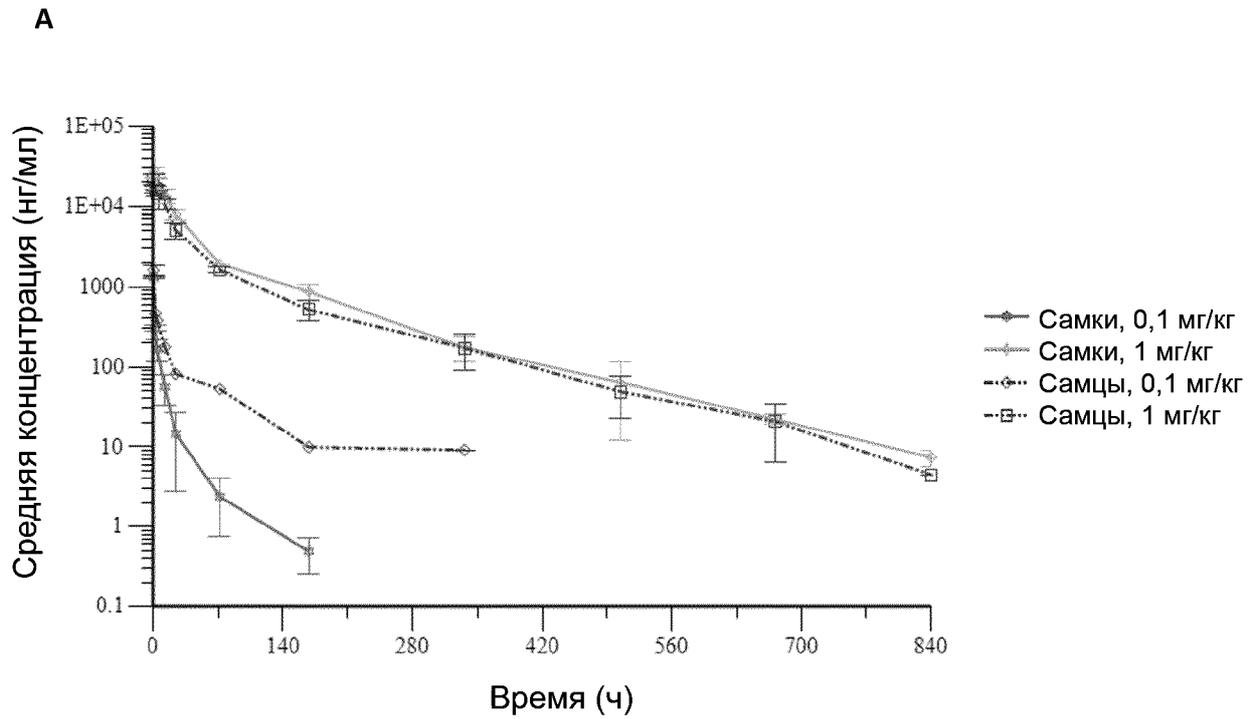
Фиг. 14



Фиг. 15

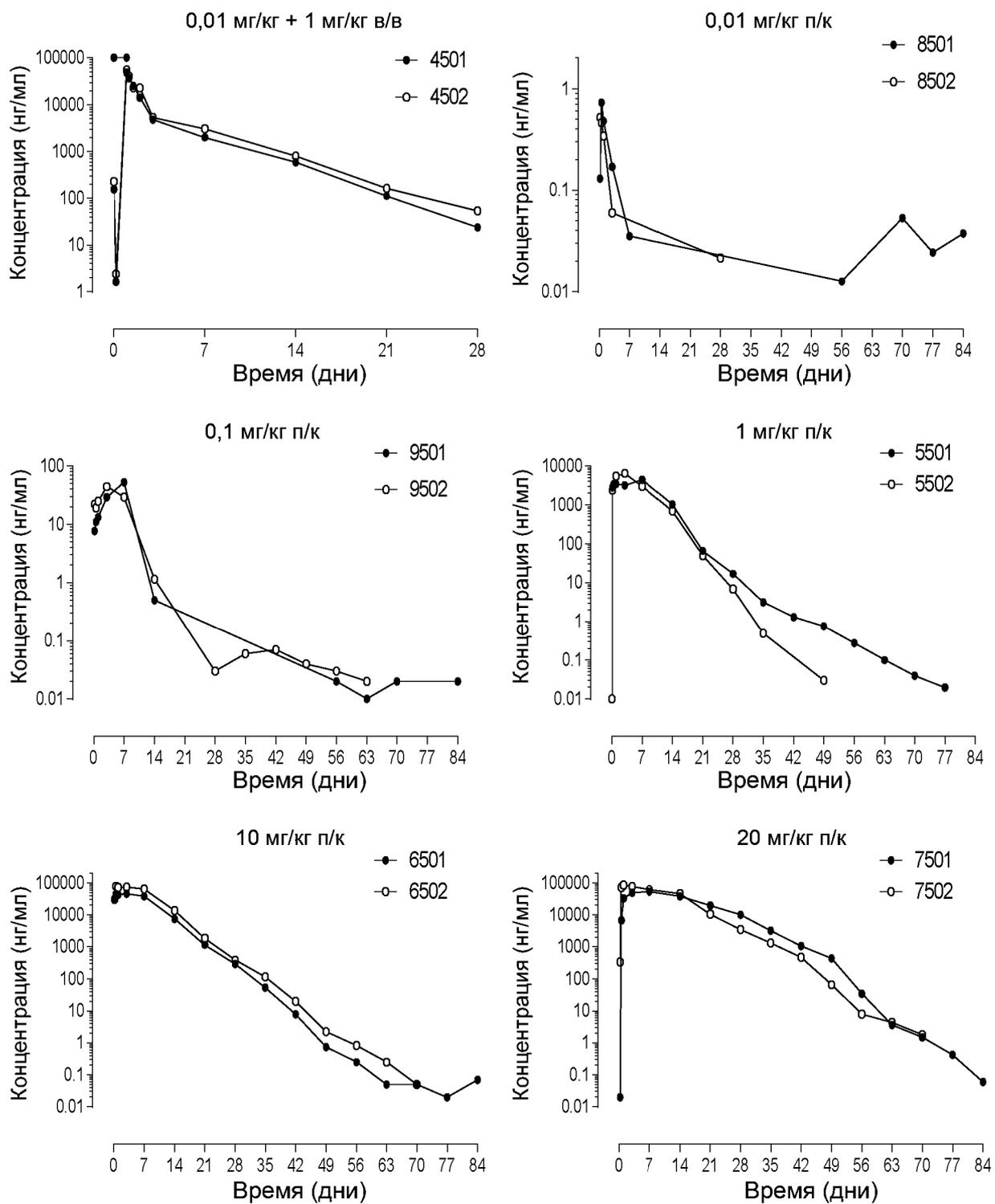


Фиг. 16

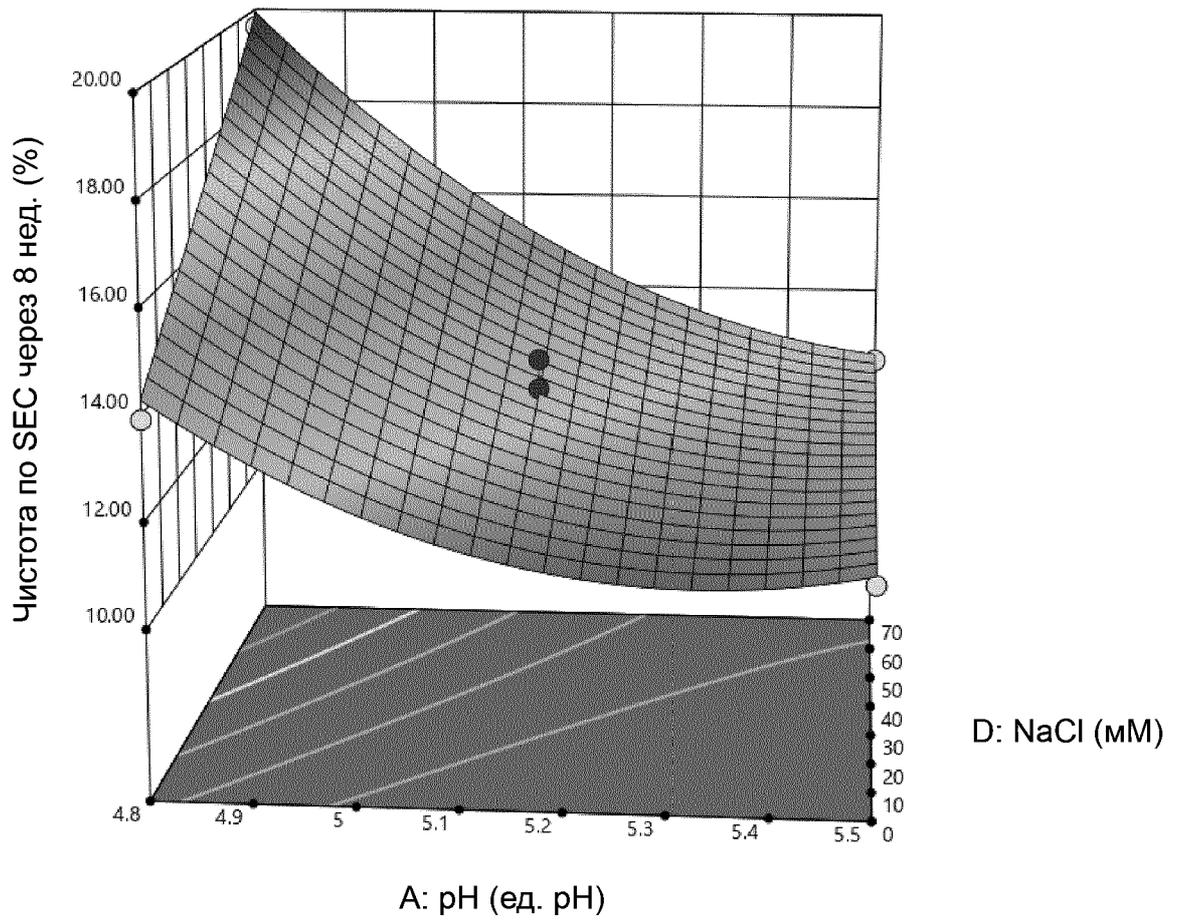


Фиг. 17

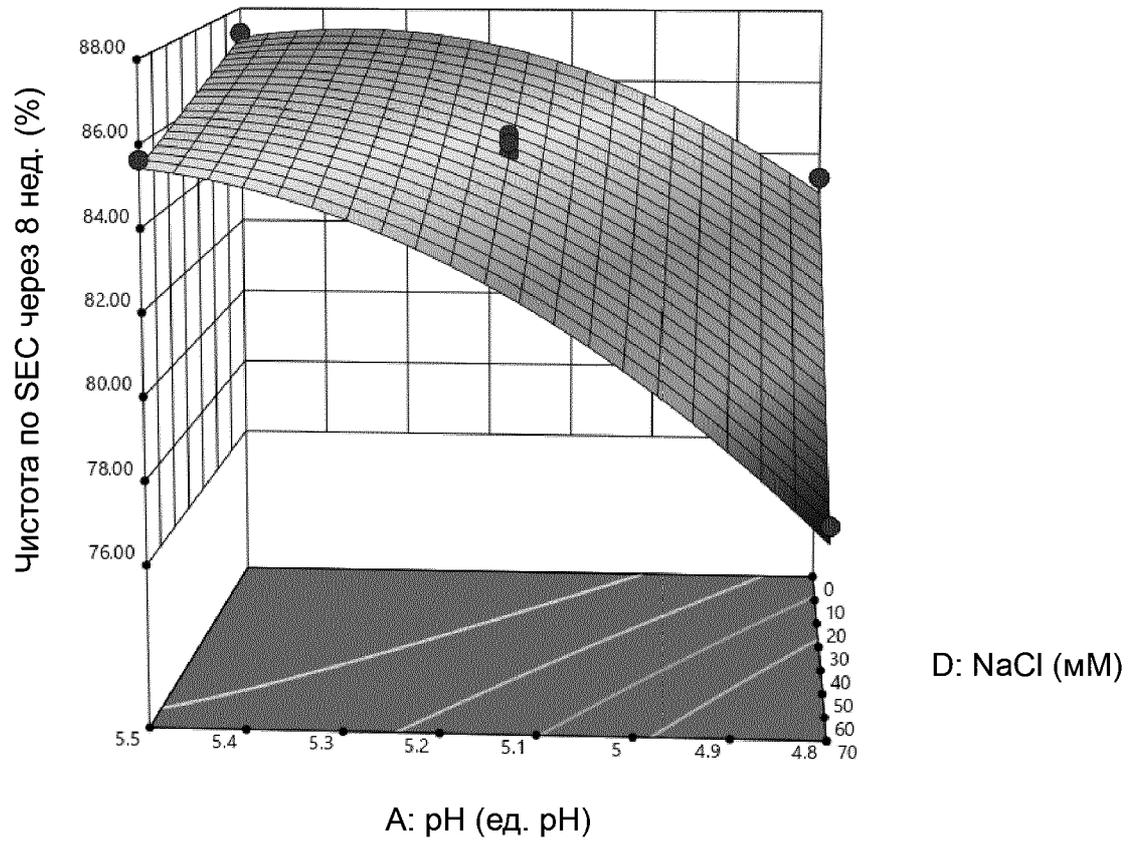
С



Фиг. 17 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 18А



Фиг. 18В