

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201791185 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.01.31

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2012.07.27

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛА АНТИ-PCSK9

(31) 61/512,666

(32) 2011.07.28

(33) US

(62) 201490370; 2012.07.27

(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Уолш Скотт, Дикс Дэниел (US)

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

(57) В настоящем изобретении предлагаются фармацевтические составы, содержащие человеческое антитело, которое специфически связывает человеческую пропротеин конвертазу субтилизин/кексин тип 9 протеазу (PCSK9). Составы, кроме антитела анти-PCSK9, могут содержать по крайней мере одну аминокислоту, по крайней мере один сахар или по крайней мере одно неионогенное поверхностно-активное вещество. Фармацевтические составы настоящего изобретения демонстрируют значительный уровень стабильности антитела после хранения в течение нескольких месяцев.

A1

201791185

201791185

A1

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛА АНТИ-PCSK9

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к лекарственным препаратам на основе
5 антител. Более конкретно, настоящее изобретение относится к области
лекарственных средств, содержащих человеческое антитело, которые
специфически связывают человеческую пропротеин конвертазу субтилизин/кексин
тип 9 протеазу (PCSK9).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 К настоящему описанию прилагается текстовой файл с перечнем
последовательностей, соответствующий требованиям ST.25. Содержание
текстового файла в силу ссылки на него включается в настоящий документ.
Прилагаемая бумажная копия перечня последовательностей, идентичная по
содержанию текстовому файлу, который соответствует требованиям ST.25,
15 является частью настоящего описания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лекарственные препараты на основе макромолекул (например антител)
должны составляться не только так, чтобы молекулы можно было бы вводить
пациентам, но обеспечивать их стабильность во время хранения и последующего
20 использования. Например, лекарственные препараты на основе антител в жидких
растворах склонны к разложению, агрегированию или нежелательной химической
модификации, если состав раствора не составлен надлежащим образом.
Стабильность того или иного антитела в жидком составе зависит не только от
природы вспомогательных средств, используемых в составе, но также и от
25 количеств и относительного соотношения различных вспомогательных средств.

Более того, при подготовке жидких препаратов на основе антител следует учитывать и другие соображения, кроме стабильности. К примерам таких дополнительных соображений относятся вязкость раствора и концентрация антитела, которая может достигаться в определенном составе, а также визуальное качество или привлекательность состава. Поэтому к разработке состава лекарственного препарата на основе антител следует подходить с особым вниманием, с тем чтобы получить препарат, который сохраняет стабильность, содержит достаточную концентрацию антитела, а также обладает приемлемой вязкостью и другими свойствами, которые позволяют удобным образом вводить состав пациентам.

Антитела к пропротеин конвертазе субтилизин/кексин тип 9 протеазе белка человека (PCSK9) являются одним из примеров терапевтически важной макромолекулы, из которой необходимо надлежащим образом приготовить фармацевтический состав. Антитела анти-PCSK9 клинически используются для лечения или профилактики таких заболеваний, как гиперхолестеринемия и другие дислипидемии, а также других отклонений. Примеры антител анти-PCSK9 описаны, среди прочего, в заявках WO 2008/057457, WO 2008/057458, WO 2008/057459, WO 2008/063382, WO 2008/125623, патенте США № 7,572,618, заявках WO 2010/077854, US 2010/0166768 и US 2011/0065902.

Несмотря на то что антитела анти-PCSK9 известны специалистам в области, по-прежнему сохраняется потребность в новых фармацевтических составах, содержащих антитела анти-PCSK9, которые достаточно стабильны и пригодны для введения пациентам.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение восполняет упомянутую выше потребность, предлагая лекарственные средства, содержащие человеческое антитело, которое

специфически связывает человеческую пропротеин конвертазу субтилизин/кексин тип 9 протеазу (PCSK9).

В одном из аспектов предлагается жидкий лекарственный препарат, содержащий: (i) человеческое антитело, которое специфически связывает человеческую пропротеин конвертазу субтилизин/кексин тип 9 протеазу (PCSK9); (ii) буфер; (iii) органический вспомогательный растворитель; (iv) стабилизатор; и в некоторых случаях (v) понизитель вязкости.

В одном из осуществлений антитело используется в концентрации от примерно $50 \pm 7,5$ мг/мл до примерно 200 ± 30 мг/мл. В другом осуществлении антитело используется в концентрации примерно 50 мг/мл $\pm 7,5$ мг/мл. В другом осуществлении антитело используется в концентрации примерно 100 мг/мл ± 15 мг/мл. В другом осуществлении антитело используется в концентрации примерно 150 мг/мл $\pm 22,5$ мг/мл. В другом осуществлении антитело используется в концентрации примерно 175 мг/мл $\pm 26,25$ мг/мл. В другом осуществлении антитело используется в концентрации примерно 200 мг/мл ± 30 мг/мл.

В одном осуществлении антитело включает одну или несколько аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:1-8. В одном осуществлении антитело содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), включающую определяющие комплементарность области тяжелой цепи 1, 2 и 3 (HCDR1-HCDR2-HCDR3), каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4, соответственно; и (b) вариабельную область легкой цепи (LCVR), включающую определяющие комплементарность области легкой цепи 1, 2 и 3 (LCDR1-LCDR2-LCDR3), каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно. В конкретном осуществлении антитело содержит HCVR и LCVR, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно.

В одном осуществлении pH жидкого препарата составляет примерно $\text{pH } 6,0 \pm 0,5$, $\text{pH } 6,0 \pm 0,4$, $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$, $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$, $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$, $\text{pH } 6,0 \pm 0,05$, $\text{pH } 6,0 \pm 0,01$, или $\text{pH } 6,0$. В конкретном осуществлении pH жидкого препарата составляет примерно $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$. В одном осуществлении жидкий фармацевтический буфер

5 содержит один или несколько буферов с эффективным диапазоном буферной емкости от примерно pH 5,5 to до примерно pH 7,4 или pKa примерно 6,0.

В одном из осуществлений буфером является гистидин. В одном из осуществлений гистидин имеет концентрацию от $5 \text{ mM} \pm 0,75 \text{ mM}$ до $50 \text{ mM} \pm 7,5 \text{ mM}$. В одном из осуществлений гистидин имеет концентрацию $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ или

10 примерно 10 mM. В одном из осуществлений гистидин имеет концентрацию $20 \text{ mM} \pm 3 \text{ mM}$ или примерно 20 mM. В одном из осуществлений гистидин имеет концентрацию $40 \text{ mM} \pm 6 \text{ mM}$ или примерно 40 mM.

В одном из осуществлений в качестве органического вспомогательного растворителя используется неионогенный полимер, содержащий полиоксиэтилен.

15 В некоторых осуществлениях органическим вспомогательным растворителем является любой или несколько из перечисленных: полисорбат 20, полоксамер 188 и полиэтиленгликоль 3350. В конкретном осуществлении органическим вспомогательным растворителем является полисорбат 20.

В одном осуществлении органический вспомогательный растворитель имеет

20 концентрацию от примерно $0,005\% \pm 0,00075\%$ до примерно $1\% \pm 0,15\%$ «веса к объему» или «вес/об», где, например, $0,1 \text{ г/мл} = 10\%$ и $0,01 \text{ г/мл} = 1\%$. В одном осуществлении органическим вспомогательным растворителем является полисорбат 20, который присутствует в концентрации примерно $0,2\% \pm 0,03\%$ вес/об. В другом осуществлении органическим вспомогательным растворителем

25 является полисорбат 20, который присутствует в концентрации $0,01\% \pm 0,0015\%$ вес/об или примерно 0,01% вес/об.

В одном из осуществлений стабилизатором является сахар. В одном из осуществлений сахар выбирается из группы, содержащей сахарозу, маннитол и трегалозу. В конкретном осуществлении стабилизатором является сахароза.

В одном осуществлении стабилизатор имеет концентрацию от $1\% \pm 0,15\%$ вес/об до $20\% \pm 3\%$ вес/об. В конкретном осуществлении стабилизатором является сахароза в концентрации $5\% \pm 0,75\%$ вес/об или примерно 5% вес/об. В другом конкретном осуществлении стабилизатором является сахароза в концентрации $10\% \pm 1,5\%$ вес/об или примерно 10% вес/об. В другом конкретном осуществлении стабилизатором является сахароза в концентрации $12\% \pm 1,8\%$ вес/об или примерно 12% вес/об.

В одном осуществлении понизителем вязкости является соль, выбираемая из группы, включающей аргинина гидрохлорид, тиоцианат натрия, тиоцианат аммония, сульфат аммония, хлорид аммония, хлорид кальция, хлорид цинка и ацетат натрия. В одном из осуществлений понизителем вязкости является L-аргинина гидрохлорид.

В одном осуществлении концентрация понизителя вязкости составляет от $10 \text{ мМ} \pm 1,5 \text{ мМ}$ до $150 \text{ мМ} \pm 22,5 \text{ мМ}$. В одном осуществлении понизителем вязкости является L-аргинина гидрохлорид в концентрации $50 \text{ мМ} \pm 7,5 \text{ мМ}$ или примерно 50 мМ . В одном осуществлении понизителем вязкости является L-аргинина гидрохлорид в концентрации $40 \text{ мМ} \pm 6 \text{ мМ}$ или примерно 40 мМ .

В одном осуществлении вязкость раствора или восстановленного лиофилизованного фармацевтического препарата при 25°C не превышает примерно $15 \text{ сПз} \pm 10\%$. В одном осуществлении вязкость при 25°C составляет от $1,0 \text{ сПз} \pm 10\%$ до $18 \text{ сПз} \pm 10\%$. В одном осуществлении вязкость при 25°C составляет $1,6 \text{ сПз} \pm 10\%$, $1,7 \text{ сПз} \pm 10\%$, $3,3 \text{ сПз} \pm 10\%$, $3,5 \text{ сПз} \pm 10\%$, $4,8 \text{ сПз} \pm 10\%$, $6,0 \text{ сПз} \pm 10\%$, $7,0 \text{ сПз} \pm 10\%$, $7,1 \text{ сПз} \pm 10\%$, $7,2 \text{ сПз} \pm 10\%$, $7,9 \text{ сПз} \pm 10\%$, $8,9 \text{ сПз} \pm 10\%$, $10,0 \text{ сПз} \pm 10\%$, $10,6 \text{ сПз} \pm 10\%$, $11,4 \text{ сПз} \pm 10\%$, $11,6 \text{ сПз} \pm 10\%$, $11,8$

сПз $\pm 10\%$, 12,4 сПз $\pm 10\%$, 13,9 сПз $\pm 10\%$, 14,0 сПз $\pm 10\%$, 15,5 сПз $\pm 10\%$ или 17,9 сПз $\pm 10\%$.

- В одном осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет от 100 ± 15 мосмоль/кг до 460 ± 69 мосмоль/кг. В одном
- 5 осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет 103 ± 15 мосмоль/кг или примерно 103 мосмоль/кг. В одном осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет 195 ± 29 мосмоль/кг или примерно 195 мосмоль/кг. В одном осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет 220 ± 33 мосмоль/кг или примерно 220
- 10 мосмоль/кг. В одном осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет 330 ± 50 мосмоль/кг или примерно 330 мосмоль/кг. В одном осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет 435 ± 65 мосмоль/кг или примерно 435 мосмоль/кг. В одном осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет 440 ± 66 мосмоль/кг или примерно 440 мосмоль/кг. В одном осуществлении осмоляльность жидкого лекарственного препарата составляет 458 ± 69 мосмоль/кг или примерно 458
- 15 мосмоль/кг.

- В одном осуществлении через три месяца хранения жидкого лекарственного препарата при -80°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней
- 20 мере 96% или по крайней мере 97% неагрегированной и неразложившейся формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные эксклюзионной хроматографии.
- В одном осуществлении через три месяца хранения жидкого лекарственного препарата при -80°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней
- 25 мере 56% неосновной и некислой формы (то есть главный пик или главная заряженная форма) антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные ионообменной хроматографии.

В одном осуществлении через три месяца хранения жидкого лекарственного препарата при -30°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней

мере 96% или по крайней мере 97% неагрегированной и неразложившейся формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные эксклюзионной хроматографии.

В одном осуществлении через три месяца хранения жидкого лекарственного препарата при -30°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 56% главной заряженной формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные ионообменной хроматографии.

В одном осуществлении через три месяца хранения жидкого лекарственного препарата при -20°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 96% или по крайней мере 97% неагрегированной и неразложившейся формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные эксклюзионной хроматографии.

В одном осуществлении через три месяца хранения жидкого лекарственного препарата при -20°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 56% главной заряженной формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные ионообменной хроматографии.

В одном осуществлении через шесть месяцев хранения жидкого лекарственного препарата при 5°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 96% неагрегированной и неразложившейся формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные эксклюзионной хроматографии.

В одном осуществлении через три месяца хранения жидкого лекарственного препарата при 5°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 58% или 59% главной заряженной формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные ионообменной хроматографии.

В одном осуществлении через шесть месяцев хранения жидкого лекарственного препарата при 25°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 94% неагрегированной и неразложившейся формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные эксклюзионной хроматографии.

В одном осуществлении через шесть месяцев хранения жидкого лекарственного препарата при 25°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней

мере 45% или 47% неосновной и некислотной формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные ионообменной хроматографии.

В одном осуществлении через 28 дней хранения жидкого лекарственного препарата при 45°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 91% или 92% неагрегированной и неразложившейся формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные эксклюзионной хроматографии. В одном осуществлении через 28 дней хранения жидкого лекарственного препарата при 45°C из жидкого лекарственного препарата выделяется по крайней мере 35% или 37% неосновной и некислотной формы антитела анти-PCSK9, что подтверждают данные ионообменной хроматографии.

В одном из аспектов предлагается жидкий лекарственный препарат, содержащий: (i) от $50 \pm 7,5$ мг/мл до 175 ± 26 мг/мл человеческого антитела, которое специфически связывает человеческую PCSK9; (ii) от 0 мМ до 40 ± 6 мМ гистидина; (iii) от 0% до $0,2\% \pm 0,03\%$ (вес/об) полисорбата 20; (iv) от 0% до $12\% \pm 1,8\%$ (вес/об) сахарозы; и (v) от 0 мМ до $50 \pm 7,5$ мМ аргинина при pH от примерно 5,3 до примерно 6,7. Антитело анти-PCSK9 настоящего аспекта содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR), так что сочетание HCVR / LCVR включает определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3 / LCDR1-LCDR2-LCDR3), которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NOs:2 – 3 – 4 / SEQ ID NOs:6 – 7 – 8, соответственно. В конкретном осуществлении антитело анти-PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR), каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно (в дальнейшем «mAb-316P»).

В одном осуществлении настоящего аспекта жидкий препарат содержит (i) $50 \pm 7,5$ мг/мл mAb-316P; (ii) $10 \pm 1,5$ мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,015\%$ (вес/об)

полисорбата 20; и (iv) $6\% \pm 0,9\%$ (вес/об) сахарозы при pH of $6,0 \pm 0,3$. В одном осуществлении данного конкретного препарата вязкость составляет примерно 1,7 сПз. В одном осуществлении данного конкретного препарата осмоляльность составляет 220 ± 44 мосмоль/кг.

- 5 В другом осуществлении жидкий препарат содержит (i) 100 ± 20 мг/мл mAb-316P; (ii) 20 ± 4 mM гистидина; (iii) $0,2\% \pm 0,04\%$ (вес/об) полисорбата 20; и (iv) $12\% \pm 2,4\%$ (вес/об) сахарозы при pH of $6,0 \pm 0,3$. В одном осуществлении данного конкретного препарата вязкость составляет примерно 3,5 сПз. В одном осуществлении данного конкретного препарата осмоляльность составляет $440 \pm$
10 88 мосмоль/кг.

- В другом осуществлении жидкий препарат содержит (i) $150 \pm 22,5$ мг/мл mAb-316P; (ii) $10 \pm 1,5$ mM гистидина; (iii) $0,2\% \pm 0,03\%$ или $0,01\% \pm 0,0015\%$ (вес/об) полисорбата 20; и (iv) $10\% \pm 1,5\%$ (вес/об) сахарозы при pH of $6,0 \pm 0,3$. В одном осуществлении данного конкретного препарата вязкость составляет примерно 6
15 сПз. В одном осуществлении данного конкретного препарата осмоляльность составляет $435 \pm 65,25$ мосмоль/кг. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения препарата при 45° в течение 28 дней $\geq 92\%$ антитела остается нативным и $\geq 35\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата
20 после хранения препарата при 25° в течение шести месяцев $\geq 94\%$ антитела остается нативным и $\geq 45\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения препарата при 5° в течение шести месяцев $\geq 96\%$ антитела остается нативным и $\geq 58\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении
25 настоящего конкретного препарата после хранения препарата при -20° в течение двенадцати месяцев $\geq 97\%$ антитела остается нативным и $\geq 56\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего

конкретного препарата после хранения препарата при -30° в течение двенадцати месяцев $\geq 97\%$ антитела остается нативным и $\geq 56\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения препарата при -80° в течение двенадцати месяцев $\geq 97\%$

- 5 антитела остается нативным и $\geq 56\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму.

- В некоторых осуществлениях настоящего конкретного препарата $\geq 85\%$ антитела сохраняет свою биологическую активность после 28 дней при 45°C , $\geq 82\%$ после 28 дней при 37°C и/или $\geq 98\%$ после 28 дней при 25°C . В некоторых
- 10 осуществлениях настоящего конкретного препарата $\geq 85\%$ антитела сохраняет свою биологическую активность после шести месяцев при -20°C , $\geq 70\%$ после шести месяцев при -30°C и/или $\geq 79\%$ после шести месяцев при -80°C . В некоторых осуществлениях настоящего конкретного препарата $\geq 81\%$ антитела сохраняет свою биологическую активность после восьми циклов замораживания-
- 15 оттаивания и/или $\geq 84\%$ антитела сохраняет свою биологическую активность после 120 минут встряхивания.

- В другом осуществлении настоящего аспекта жидкий препарат содержит (i) $175 \pm 26,25$ мг/мл mAb-316P; (ii) $10 \pm 1,5$ mM гистидина; (iii) $0,01\% \pm 0,0015\%$ (вес/об) полисорбата 20; (iv) $5\% \pm 0,75\%$ (вес/об) сахарозы; и (v) $50 \pm 7,5$ mM аргинина при
- 20 $6,0 \pm 0,3$. В одном осуществлении данного конкретного препарата вязкость составляет примерно 10,6 сПз. В одном осуществлении данного конкретного препарата осмоляльность составляет 330 ± 50 мосмоль/кг. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения препарата при 45° в течение 28 дней $\geq 91\%$ антитела остается нативным и $\geq 38\%$ антитела
- 25 сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения препарата при 25° в течение шести месяцев $\geq 94\%$ антитела остается нативным и $\geq 47\%$ антитела сохраняет главную

заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения препарата при 5° в течение шести месяцев $\geq 96\%$ антитела остается нативным и $\geq 59\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения

5 препарата при -20° в течение трех месяцев $\geq 96\%$ антитела остается нативным и $\geq 56\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного препарата после хранения препарата при -30° в течение трех месяцев $\geq 96\%$ антитела остается нативным и $\geq 56\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму. В одном осуществлении настоящего конкретного

10 препарата после хранения препарата при -80° в течение трех месяцев $\geq 96\%$ антитела остается нативным и $\geq 56\%$ антитела сохраняет главную заряженную форму.

В одном аспекте жидкий лекарственный препарат любого из приведенных выше осуществлений помещается в контейнер. В одном из осуществлений в

15 качестве контейнера используется флакон из поликарбоната. В другом осуществлении в качестве контейнера используется стеклянный флакон. В одном из осуществлений стеклом является боросиликатное стекло типа 1 с пробкой из бутилкаучука, покрытой фторуглеводородами. В другом осуществлении в качестве контейнера используется микроинжектор. В другом осуществлении в качестве

20 контейнера используется шприц. В конкретном осуществлении поршень шприца покрыт фторуглеводородами. В одном из конкретных осуществлений в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц объемом 1 мл, содержащий менее 500 миллиардных долей вольфрама, с иглой размером 27-G, пробкой из бутилкаучука с покрытием фторуглеводородами, а также не содержащим латекса,

25 нецитотоксическим защитным резиновым колпачком. В более конкретном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц NUOVA OMPI объемом 1 мл с тонкостенной иглой размером 27-G, с пробкой из бутилкаучука с покрытием FLUROTEC 4023/50 и защитным резиновым колпачком

FM 27. В другом конкретном осуществлении в качестве шприца используется пластиковый шприц объемом 1 мл или 3 мл с иглой размером 27-G. В более конкретном осуществлении пластиковый шприц поставляется компанией BECTON DICKINSON.

- 5 **В одном аспекте** предлагается фармацевтический препарат, содержащий (a) 175 мг/мл $\pm$ 26,25 мг/мл антитела анти-PCSK9, (b) 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,01% вес/об $\pm$ 0,0015% полисорбата 20, (d) 5% вес/об $\pm$ 0,75% сахарозы, и (e) 50 мМ $\pm$ 7,5 мМ аргинина, в котором (a) антитело содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5, (b) более 90% антител в препарате имеет
- 10 молекулярный вес 155 кДа $\pm$ 1 кДа, (c) более 50% антител в препарате имеет изоэлектрическую точку примерно 8,5, и (d) от 75% до 90% антител в препарате фукозилированы.

- В одном осуществлении фармацевтический препарат содержит (a) 175 мг/мл $\pm$ 26,25 мг/мл антитела анти-PCSK9 из предыдущего абзаца, (b) 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ
- 15 гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,01% вес/об $\pm$ 0,0015% полисорбата 20, (d) 5% вес/об $\pm$ 0,75% сахарозы, и (e) 50 мМ $\pm$ 7,5 мМ аргинина в воде.

- В одном аспекте** предлагается фармацевтический препарат, содержащий (a) 150 мг/мл $\pm$ 22,5 мг/мл антитела анти-PCSK9, (b) 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,2% вес/об $\pm$ 0,03% полисорбата 20, (d) 10% вес/об $\pm$ 1,5% сахарозы, в
- 20 котором (i) антитело содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5, (ii) более 90% антител в препарате имеет молекулярный вес 155 кДа $\pm$ 1 кДа, (iii) более 50% антител в препарате имеет изоэлектрическую точку примерно 8,5, и (iv) от 75% до 90% антител в препарате фукозилированы.

- В одном осуществлении фармацевтический препарат содержит (a) 150 мг/мл $\pm$
- 25 22,5 мг/мл антитела анти-PCSK9 из предыдущего абзаца, (b) 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,2% вес/об $\pm$ 0,03% полисорбата 20, (d) 10% вес/об $\pm$ 1,5% сахарозы в воде.

В одном аспекте предлагается фармацевтический препарат, содержащий (a) 150 мг/мл $\pm$ 22,5 мг/мл антитела анти-PCSK9, (b) 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,01% вес/об $\pm$ 0,0015% полисорбата 20, и (d) 10% вес/об $\pm$ 1,5% сахарозы, в котором (i) антитело содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5, (ii) более 90% антител в препарате имеет молекулярный вес 155 кДа $\pm$ 1 кДа, (iii) более 50% антител в препарате имеет изоэлектрическую точку примерно 8,5, и (iv) от 75% до 90% антител в препарате фукозилированы.

В одном осуществлении фармацевтический препарат содержит (a) 150 мг/мл $\pm$ 22,5 мг/мл антитела анти-PCSK9 из предыдущего абзаца, (b) 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,01% вес/об $\pm$ 0,0015% полисорбата 20, и (d) 10% вес/об $\pm$ 1,5% сахарозы в воде.

В одном аспекте предлагается фармацевтический препарат, содержащий (a) 100 мг/мл $\pm$ 15 мг/мл антитела анти-PCSK9, (b) 20 мМ $\pm$ 3 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,2% вес/об $\pm$ 0,03% полисорбата 20, (d) 12% вес/об $\pm$ 1,8% сахарозы, в котором (i) антитело содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5, (ii) более 90% антител в препарате имеет молекулярный вес 155 кДа $\pm$ 1 кДа, (iii) более 50% антител в препарате имеет изоэлектрическую точку примерно 8,5, и (iv) от 75% до 90% антител в препарате фукозилированы.

В одном осуществлении фармацевтический препарат содержит (a) 100 мг/мл $\pm$ 15 мг/мл антитела анти-PCSK9 из предыдущего абзаца, (b) 20 мМ $\pm$ 3 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,2% вес/об $\pm$ 0,03% полисорбата 20, и (d) 12% вес/об $\pm$ 1,8% сахарозы в воде.

В одном аспекте предлагается фармацевтический препарат, содержащий (a) 50 мг/мл $\pm$ 7,5 мг/мл антитела, (b) 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ гистидина, pH 6 $\pm$ 0,3, (c) 0,1% вес/об $\pm$ 0,015% полисорбата 20, (d) 6% вес/об $\pm$ 0,9% сахарозы, в котором (i) антитело содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5, (ii) более 90% антител в препарате имеет молекулярный вес 155 кДа $\pm$ 1 кДа, (iii) более 50%

антител в препарате имеет изоэлектрическую точку примерно 8,5, и (iv) от 75% до 90% антител в препарате фукозилированы.

В одном осуществлении фармацевтический препарат содержит (a) 50 мг/мл $\pm$ 7,5 мг/мл антитела анти-PCSK9 из предыдущего абзаца, (b) 10 мМ $\pm$ 1.5 мМ гистидина, pH $6 \pm 0,3$, (c) 0,1% вес/об $\pm$ 0,015% полисорбата 20, и (d) 6% вес/об $\pm$ 0,9% сахарозы в воде.

В одном аспекте приводится способ приготовления лиофилизованного препарата, который содержит антитело анти-PCSK9 и менее 0,3% воды. Способ включает следующие стадии: (a) смешивание в стеклянном флаконе воды, антитела анти-PCSK9, гистидина, сахарозы и полисорбата 20, (b) последующее выдерживание смеси примерно при 5°C в течение примерно 60 минут, (c) последующее снижение температуры со скоростью примерно 0.5°C в минуту, (d) последующее выдерживание смеси примерно при -45°C в течение примерно 120 минут, (e) последующее снижение атмосферного давления примерно до 100 мТорр, (f) последующее повышение температуры со скоростью примерно 0.5°C в минуту, (g) последующее выдерживание смеси примерно при -25°C в течение примерно 78 часов, (h) последующее увеличение температуры со скоростью 0.2°C в минуту, (i) последующее выдерживание смеси примерно при 35°C в течение примерно 6 часов, (j) последующее снижение температуры со скоростью примерно 0.5°C, (k) а также последующее выдерживание смеси примерно при 25°C в течение примерно 60 минут до передачи на хранение.

В одном осуществлении способ также включает следующие стадии: (l) заполнение стеклянного флакона, содержащего смесь после стадии (k), газообразным азотом, и (m) укупорка флакона под давлением на уровне примерно 80% от атмосферного. В одном осуществлении смесь доводят до температуры 2-8°C после стадии (i), (j) или (k) и перед стадией укупорки флакона.

В некоторых осуществлениях на стадии (а) концентрация антитела анти-PCSK9 составляет 50 мг/мл $\pm$ 7,5 мг/мл, концентрация гистидина составляет 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ (рН 6,0), концентрация полисорбата 20 составляе 0,1% $\pm$ 0,015%, а концентрация сахара составляет 6% $\pm$ 0,9%. В одном осуществлении антитело

5 анти-PCSK9 содержит HCDR1 из SEQ ID NO:2, HCDR2 из SEQ ID NO:3, HCDR3 из SEQ ID NO:4, LCDR1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO:7 и LCDR3 из SEQ ID NO:8.mAb-316P. В одном осуществлении антитело анти-PCSK9 содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5. В одном осуществлении (i) антитело содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5, (ii) более 90% антител в

10 смеси имеет молекулярный вес 155 кДа $\pm$ 1 кДа, (iii) более 50% антител в смеси имеет изoeлектрическую точку примерно 8,5, и (iv) от 75% до 90% антител в смеси фукозилированы.

В одном аспекте приводится способ приготовления лиофилизованного препарата, который содержит антитело анти-PCSK9 и менее 0,3% воды, который

15 готовится в соответствии со способом в предыдущем аспекте.

В одном аспекте предлагается фармацевтический препарат, который содержит лиофилизированный фармацевтический препарат предыдущего аспекта, разведенный в воде. В одном осуществлении фармацевтический препарат содержит 50 мг/мл $\pm$ 7,5 мг/мл антитела анти-PCSK9, 10 мМ $\pm$ 1.5 мМ гистидина

20 (рН 6.0), 0,1% $\pm$ 0,015% полисорбата 20 и 6% $\pm$ 0,9% сахарозы в воде. В одном осуществлении фармацевтический препарат содержит 100 мг/мл $\pm$ 15 мг/мл антитела анти-PCSK9, 20 мМ $\pm$ 3 мМ гистидина (рН 6.0), 0,2% $\pm$ 0,03% полисорбата 20 и 12% $\pm$ 1,8% сахарозы в воде. В другом осуществлении фармацевтический препарат содержит 150 мг/мл $\pm$ 22,5 мг/мл антитела анти-

25 PCSK9, 30 мМ $\pm$ 4,5 мМ гистидина (рН 6.0), 0,3% $\pm$ 0,045% полисорбата 20 и 18% $\pm$ 2,7% сахарозы в воде. В еще одном осуществлении фармацевтический препарат содержит 175 мг/мл $\pm$ 26,25 мг/мл антитела анти-PCSK9, 35 мМ $\pm$ 5,25 мМ

гистидина (pH 6.0), $0,35\% \pm 0,0525\%$ полисорбата 20 и $21\% \pm 3,15\%$ сахарозы в воде.

В некоторых осуществлениях антитело анти-PCSK9 содержит HCVD из SEQ ID NO:1 и LCVD из SEQ ID NO:5, и (b) более 90% антител в смеси имеет

5 молекулярный вес $155 \text{ кДа} \pm 1 \text{ кДа}$, (c) более 50% антител в смеси имеет изоэлектрическую точку примерно 8,5, и (d) от 75% до 90% антител в смеси фукозилированы.

В одном аспекте предлагается лекарственный препарат любого из приведенных выше осуществлений, причем упомянутый препарат помещается в

10 контейнер. В одном осуществлении в качестве контейнера используется флакон, который в некоторых осуществлениях представляет собой стеклянный флакон. В другом осуществлении в качестве контейнера используется шприц. В некоторых приложениях в качестве шприца используют шприц из стекла с низким содержанием вольфрама. В одном осуществлении в качестве шприца

15 используется длинный стеклянный шприц NUOVA OMPI объемом 1 мл с тонкостенной иглой размером 27-G, с пробкой из бутылкаучука с покрытием FLUROTEC 4023/50 и защитным резиновым колпачком FM 27.

В одном аспекте предлагается комплект, в который входят лекарственный препарат любого из приведенных выше аспектов, контейнер и указания по

20 применению. В одном осуществлении в качестве контейнера используется предварительно заполненный шприц. В конкретном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц NUOVA OMPI объемом 1 мл с тонкостенной иглой размером 27-G, с пробкой из бутылкаучука с покрытием FLUROTEC 4023/50 и защитным резиновым колпачком а FM 27.

25 Другие осуществления настоящего изобретения станут очевидны при ознакомлении с приведенным ниже подробным описанием.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Прежде чем приступить к описанию настоящего изобретения, необходимо отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными способами и изложенными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут меняться. Следует также понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных 5 осуществлений и не носит ограничительного характера, поскольку охват настоящего изобретения ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в 10 настоящем документе, имеют такое же значение, которое общеизвестно рядовым специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение.

Используемый в настоящем документе термин «примерно» в отношении конкретного упоминаемого численного значения или диапазона значений подразумевает, что значение может отклоняться от значения не более чем на 1%. 15 Например, используемое в настоящем документе выражение «примерно 100» охватывает 99 и 101, и все значения между ними (то есть 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

Хотя на практике или при проверке настоящего изобретения могут использоваться любые способы и материалы, аналогичные или идентичные 20 описанным в настоящем документе, ниже приводится описание предпочтительных способов и материалов. Все публикации, упоминаемые в настоящем документе, включаются в него полностью в силу ссылки на них.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ

Используемое в настоящем документе выражение «фармацевтический 25 состав/препарат» означает смесь по крайней мере одного активного ингредиента (например малой молекулы, макромолекулы, соединения и пр., которые в состоянии оказывать биологическое воздействие на человека или на животных) и

по крайней мере одного неактивного ингредиента, который в сочетании с активным ингредиентом или одним или несколькими неактивными ингредиентами пригоден для терапевтического применения на человеке или животном. Термин «состав/препарат», используемый в настоящем документе, если специально не оговорено иначе, означает «фармацевтический состав/препарат». Настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим по крайней мере один лечебный полипептид. В соответствии с определенными осуществлениями настоящего изобретения под лечебным полипептидом понимается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с человеческой пропротеин конвертазой субтилизин/кексин тип 9 (PCSK9). Более конкретно, настоящее изобретение включает фармацевтические препараты, которые содержат: (i) человеческое антитело, которое специфически связывается с человеческой PCSK9 (ii) гистидиновый буфер; (iii) органический вспомогательный растворитель, который представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество; (iv) термический стабилизатор, которым является углевод; и в некоторых случаях (v) понизитель вязкости, которым является соль. Конкретные примеры компонентов и составов, включенных в настоящее изобретение, подробно описаны ниже.

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮТСЯ С PCSK9

Фармацевтические составы настоящего изобретения могут включать человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с человеческой PCSK9. Используемый в настоящем документе термин «PCSK9» означает пропротеин конвертазу человека, относящуюся к подсемейству протеиназ К семейства секреторных субтилаз. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что PCSK9 повышает уровень ЛНП в плазме за счет связывания с рецептором частиц липопротеинов низкой плотности и стимулирования его распада. Пример аминокислотной последовательности

человеческой PCSK9 приводится в SEQ ID NO:9. Антитела к человеческой PCSK9 описаны в публикациях патентных заявок US 2010/0166768, US 2011/0065902 и WO 2010/077854.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» в общем случае
5 предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, составленных из четырех полипептидных цепей, при этом две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи связываются друг с другом дисульфидными связями, а также для обозначения их мультимеров (например IgM); при этом молекулы иммуноглобулина, содержащие только тяжелые цепи (то есть без легких цепей),
10 также включаются в охват термина «антитело». Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе HCVR, или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно называемую в
15 настоящем документе LCVR, или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области V_H и V_L могут подразделяться на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), перемежаемые областями с более высоким уровнем консервативности, называемые остовными областями (FR). Каждая область V_H и V_L образована тремя CDR и четырьмя FR,
20 расположенными от amino-терминального конца к карбокси-терминальному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Если специально не оговорено иначе, термин «антитело», используемый в настоящем документе, следует понимать, как включающий полные молекулы
25 антител, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемый в настоящем документе термин «антиген-связывающая часть» или «антиген-связывающий фрагмент» антитела (или просто «часть антитела» или «фрагмент антитела») обозначает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют

способность к специфическому связыванию с PCSK9 человека или с его эпитопом.

Используемый в настоящем документе термин «изолированное антитело» предназначен для обозначения антитела, существенно свободного от других антител, обладающих иной антигенной специфичностью (например, 5 изолированное антитело, которое специфически связывает PCSK9 человека, существенно свободно от антител, которые специфически связывают антигены, отличные от PCSK9 человека).

Термин «специфически связываются» или ему подобные означает, что 10 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который сравнительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может описываться константой диссоциации по крайней мере примерно 1×10^{-6} М или выше. Методы определения специфического связывания молекул известны специалистам в области и включают, например, равновесный 15 диализ, поверхностный плазмонный резонанс и пр. Изолированное антитело, которое специфически связывает PCSK9 человека, тем не менее, может проявлять перекрестную реактивность к другим антигенам, например молекулам PCSK9 из других видов (ортологов). В контексте настоящего изобретения мультиспецифические (например биспецифические) антитела, которые 20 связываются с человеческой PCSK9, а также одним или несколькими другими антигенами, считаются «специфически связывающимися» с человеческой PCSK9. Более того, изолированное антитело может быть существенно свободно от иных клеточных материалов или химических реагентов.

Примеры античеловеческих антител PCSK9, которые могут входить в 25 фармацевтические составы настоящего изобретения, приводятся в публикациях патентных заявок US 2010/0166768, US 2011/0065902 и WO 2010/077854, раскрытие которых в силу ссылки на них полностью включается в текст настоящего документа.

В соответствии с определенными осуществлениями настоящего изобретения античеловеческое антитело PCSK9 mAb-316P представляет собой человеческий IgG1, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет субтипIGHV3-23 и вариабельную область легкой цепи, которая имеет субтип IGKV4-1 (см. Barbie and Lefranc, The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments, Exp. Clin. Immunogenet. 1998; 15:171-183; и Scaviner, D. et al., Protein Displays of the Human Immunoglobulin Heavy, Kappa and Lambda Variable and Joining Regions, Exp. Clin. Immunogenet., 1999; 16:234-240).

В некоторых осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 mAb-316P содержит по крайней мере одно аминокислотное замещение, что приводит к изменению заряда на внешней поверхности антитела относительно эмбриональной последовательности IGKV4-1. Эмбриональная последовательность IGKV4-1 и номера позиций аминокислот, приведенные в настоящем документе, соответствуют Международной иммуногенетической информационной системе (IMGT), которая описана в Lefranc, M.-P., et al., IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, Nucl. Acids Res, 37, D1006-D1012 (2009). В некоторых осуществлениях внешняя поверхность включает определяющую комплементарность область (CDR). В некоторых осуществлениях аминокислотное замещение или замещения выбираются из группы, включающей замещение незаряженной полярной аминокислоты на основную аминокислоту в пределах CDR1 (например в положении 32) IGKV4-1. Уникальные пермутации в распределении зарядов антитела, особенно на границе со средой (например в CDR), предположительно будут создавать непредсказуемые условия для поддержания или улучшения стабильности антитела в растворе.

В некоторых осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 mAb-316P содержит по крайней мере одно аминокислотное замещение, что приводит к изменению заряда в основной области вариабельной области антитела относительно эмбриональной последовательности IGHV3-23 или эмбриональной

последовательности IGKV4-1. В некоторых осуществлениях аминокислотное замещение или замещения выбираются из группы, включающей (а) замещение полярной аминокислоты в остовной области 3 (FR3) (например в положении 77)IGHV3-23 на гидрофобную аминокислоту, и (b) замещение основной

5 аминокислоты в остовной области 2 (FR2) (например в положении 51) IGKV4-1 на полярную аминокислоту. Изменения в способности пептидной цепи к фолдингу, особенно в пределах остовной области, которая влияет на интерфейс между CDR и растворителем, будет, предположительно, создавать непредсказуемые условия для поддержания или улучшения стабильности антитела в растворе.

10 В соответствии с рядом осуществлений настоящего изобретения античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь определяющей комплементарность области (HCDR) 1 из SEQ ID NO: 2, HCDR2 из SEQ ID NO:3 и HCDR3 из SEQ ID NO: 4. В некоторых осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий

15 фрагмент содержит HCVD из SEQ ID NO:1.

В соответствии с рядом осуществлений настоящего изобретения античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую (каппа) цепь определяющей комплементарность области (LCDR) 1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO: 7 и LCDR3 из SEQ ID NO: 8. В некоторых

20 осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVD из SEQ ID NO:5.

Неограничивающий пример антитела, используемый в примерах, называют «mAb-316P». Такое антитело, которое в US 7,608,693 также называлось H4H098P. mAb-316P (H4H098P), содержит пару аминокислотных последовательностей

25 HCVR/LCVR с SEQ ID NOs:1/5, а также домены HCDR1-HCDR2-HCDR3 / LCDR1-LCDR2-LCDR3, представленные последовательностями SEQ ID NOs:2 – 3 – 4 / SEQ ID NOs:6 – 7 – 8.

Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащееся в фармацевтических составах настоящего изобретения, можно менять в зависимости от желаемых конкретных свойств составов, а также конкретных обстоятельств и целей, для достижения которых предполагается использовать составы. В определенных осуществлениях фармацевтическими составами являются жидкие препараты, которые могут содержать от $50 \pm 7,5$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл антитела; от 60 ± 9 мг/мл до 240 ± 36 мг/мл антитела; от $70 \pm 10,5$ мг/мл до $230 \pm 34,5$ мг/мл антитела; от 80 ± 12 мг/мл до 220 ± 33 мг/мл антитела; от $90 \pm 13,5$ мг/мл до $210 \pm 31,5$ мг/мл антитела; от 100 ± 15 мг/мл до 200 ± 30 мг/мл антитела; от $110 \pm 16,5$ мг/мл до $190 \pm 28,5$ мг/мл антитела; от 120 ± 18 мг/мл до 180 ± 27 мг/мл антитела; от $130 \pm 19,5$ мг/мл до $170 \pm 25,5$ мг/мл антитела; от 140 ± 21 мг/мл до 160 ± 24 мг/мл антитела; $150 \pm 22,5$ мг/мл антитела или $175 \pm 26,25$ мг/мл. Например, составы настоящего изобретения могут содержать примерно 50 мг/мл; примерно 60 мг/мл; примерно 65 мг/мл; примерно 70 мг/мл; примерно 75 мг/мл; примерно 80 мг/мл; примерно 85 мг/мл; примерно 90 мг/мл; примерно 95 мг/мл; примерно 100 мг/мл; примерно 105 мг/мл; примерно 110 мг/мл; примерно 115 мг/мл; примерно 120 мг/мл; примерно 125 мг/мл; примерно 130 мг/мл; примерно 135 мг/мл; примерно 140 мг/мл; примерно 145 мг/мл; примерно 150 мг/мл; примерно 155 мг/мл; примерно 160 мг/мл; примерно 165 мг/мл; примерно 170 мг/мл; примерно 175 мг/мл; примерно 180 мг/мл; примерно 185 мг/мл; примерно 190 мг/мл; примерно 195 мг/мл; примерно 200 мг/мл; примерно 205 мг/мл; примерно 210 мг/мл; примерно 215 мг/мл; примерно 220 мг/мл; примерно 225 мг/мл; примерно 230 мг/мл; примерно 235 мг/мл; примерно 240 мг/мл; примерно 245 мг/мл; или примерно 250 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с человеческим PCSK9.

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА и pH

Лекарственные препараты настоящего изобретения могут также содержать одно или несколько вспомогательных веществ. Используемый в настоящем документе термин «вспомогательное вещество» означает любой нелекарственный агент, добавляемый к препарату для достижения необходимой
5 консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта.

В некоторых осуществлениях фармацевтический препарат настоящего изобретения содержит по крайней мере один органический вспомогательный растворитель такого рода и в таких количествах, которые стабилизируют человеческое антитело PCSK9 при грубом обращении или взбалтывании,
10 например, при встряхивании. В некоторых осуществлениях под «стабилизируют» понимается предупреждение образования более 3% агрегированного антитела от общего количества антитела (на молярной основе) при грубом воздействии. В некоторых осуществлениях под грубым воздействием понимают встряхивание раствора, содержащего антитело и органический вспомогательный растворитель
15 в течение примерно 60 минут или примерно 120 минут.

В некоторых осуществлениях органическим вспомогательным растворителем является неионогенное поверхностно-активное соединение, например алкилполиэтиленоксид. К характерным неионогенным поверхностно-активным веществам, которые могут входить в препарат настоящего изобретения,
20 относятся, например, полисорбаты, например полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полуксамеры, например полуксамер 181, полуксамер 188, полуксамер 407 или полиэтиленгликоль (PEG). Полисорбат 20 также известен под названием TWEEN 20, сорбитан монолаурат и полиоксиэтиленсорбитан
25 монолаурат. Полуксамер 188 также известен как PLURONIC F68.

Количество неионогенного поверхностно-активного вещества, содержащееся в фармацевтических составах настоящего изобретения, можно менять в зависимости от желаемых конкретных свойств составов, а также конкретных

обстоятельств и целей, для достижения которых предполагается использовать составы. В некоторых осуществлениях составы могут содержать от 0,01% ± 0,0015% до 0,2% ± 0,03% поверхностно-активного вещества. Например, составы настоящего изобретения могут содержать примерно 0,0085%; примерно 0,01%;
 5 примерно 0,02%; примерно 0,03%; примерно 0,04%; примерно 0,05%; примерно 0,06%; примерно 0,07%; примерно 0,08%; примерно 0,09%; примерно 0,1%; примерно 0,11%; примерно 0,12%; примерно 0,13%; примерно 0,14%; примерно 0,15%; примерно 0,16%; примерно 0,17%; примерно 0,18%; примерно 0,19%; примерно 0,20%; примерно 0,21%; примерно 0,22%; или примерно 0,23%
 10 полисорбата 20 или полоксамера 188.

Фармацевтические препараты настоящего изобретения могут также содержать один или несколько стабилизаторов такого рода и в таких количествах, которые стабилизируют человеческое антитело PCSK9 в условиях теплового стресса. В некоторых осуществлениях «стабилизируют» означает сохранение более
 15 примерно 91% антитела в нативной конформации в условиях, когда раствор, содержащий антитело и термический стабилизатор, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно до 28 дней. В некоторых осуществлениях под «стабилизируют» означает агрегирование менее примерно 6% антитела в условиях, когда раствор, содержащий антитело и термический
 20 стабилизатор, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно 28 дней. Используемый в настоящем документе термин «нативный» означает основную форму антитела, которая определяется по эксклюзионной хроматографии и обычно представляет собой интактный мономер антитела.

В некоторых осуществлениях термическим стабилизатором является сахар
 25 или сахароспирт, выбираемый из сахарозы, трегалозы и маннитола, или любого их сочетания, количество которого в препарате можно менять в зависимости от конкретных обстоятельств и целей, для достижения которых предполагается

использовать составы. В некоторых осуществлениях препараты могут содержать от примерно 3% до примерно 14% сахара или сахароспирта; от примерно 4% до примерно 13% сахара или сахароспирта; от примерно 5 % до примерно 12% сахара или сахароспирта; от примерно 6% до примерно 11% сахара или сахароспирта; от примерно 7% до примерно 10% сахара или сахароспирта; от примерно 8% до примерно 9% сахара или сахароспирта; от примерно 4% до примерно 6% сахара или сахароспирта; от примерно 5% до примерно 7% сахара или сахароспирта; от примерно 9% до примерно 11% сахара или сахароспирта; или от примерно 11% до примерно 13% сахара или сахароспирта. Например, фармацевтические препараты настоящего изобретения могут содержать $4\% \pm 0,6\%$; $5\% \pm 0,75\%$; $6\% \pm 0,9\%$; $7\% \pm 1,05\%$; $8\% \pm 1,2\%$; $9\% \pm 1,35\%$; $10\% \pm 1,5\%$; $11\% \pm 1,65\%$; $12\% \pm 1,8\%$; $13\% \pm 1,95\%$; или примерно $14\% \pm 2,1\%$ сахара или сахароспирта (например сахарозы, трегалозы или маннитола).

Фармацевтические препараты настоящего изобретения могут также содержать буфер или буферную систему, которые служат для поддержания стабильного pH и способствуют стабилизации человеческого антитела PCSK9. В некоторых осуществлениях под «стабилизируют» означает агрегирование менее примерно $4,5\% \pm 0,5\%$ или менее $6,0 \pm 0,5\%$ антитела в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях «стабилизируют» означает агрегирование менее примерно $3\% \pm 0,5\%$ или менее $2,6 \pm 0,5\%$ антитела в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 37°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях под «стабилизируют» понимается, что по крайней мере $91\% \pm 0,5\%$ или по крайней мере $92\% \pm 0,5\%$ антитела по данным эксклюзионной хроматографии остается в своей нативной конформации в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно

- 45°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях под «стабилизируют» понимается, что по крайней мере $94\% \pm 0,5\%$ или по крайней мере $95\% \pm 0,5\%$ антитела по данным эксклюзионной хроматографии остается в своей нативной конформации в условиях, когда раствор, содержащий антитело и
- 5 буфер, выдерживают при температуре примерно 37°C в течение примерно 28 дней. Под «нативным» или «нативной конформацией» подразумевают долю антитела, которая не подверглась агрегированию или распаду. Это обычно определяется по результатам анализа, при котором определяется относительный размер частиц антитела, например методом эксклюзионной хроматографии.
- 10 Неагрегированное и неразложившееся антитело элюируется во фракции, которая идентична нативному антителу и, как правило, является основной фракцией элюата. Агрегированное антитело элюируется во фракции, которая указывает на размеры, превышающие размеры нативного антитела. Разложившееся антитело элюируется во фракции, которая указывает на размеры,
- 15 меньшие размеров нативного антитела.

- В некоторых осуществлениях под «стабилизируют» понимается, что по крайней мере $38\% \pm 0,5\%$ или по крайней мере $29\% \pm 0,5\%$ антитела по данным катионообменной хроматографии остается в своей главной заряженной форме в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при
- 20 температуре примерно 45°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях под «стабилизируют» понимается, что по крайней мере $46\% \pm 0,5\%$ или по крайней мере $39\% \pm 0,5\%$ антитела по данным катионообменной хроматографии остается в своей главной заряженной форме в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно
- 25 37°C в течение примерно 28 дней. Под «главным зарядом» или «главной заряженной формой» подразумевают фракцию антитела, которая элюируется с

ионообменной смолы в главном пике, к которому с одной стороны примыкают более «основные» пики, а с другой стороны — более «кислые» пики.

Фармацевтические составы настоящего изобретения могут иметь pH от примерно 5,2 до примерно 6,4. Например, составы настоящего изобретения могут
 5 иметь pH примерно 5,5; примерно 5,6; примерно 5,7; примерно 5,8; примерно 5,9; примерно 6,0; примерно 6,1; примерно 6,2; примерно 6,3; примерно 6,4; или примерно 6,5. В некоторых осуществлениях pH составляет $6,0 \pm 0,4$; $6,0 \pm 0,3$; $6,0 \pm 0,2$; $6,0 \pm 0,1$; примерно 6,0; или 6,0.

В некоторых осуществлениях буфер или буферная система включают по
 10 крайней мере один буфер с диапазоном буферной емкости, который полностью или частично перекрывается с интервалом pH 5,5 – 7,4. В одном осуществлении буфер имеет pKa примерно $6,0 \pm 0,5$. В некоторых осуществлениях буфером является гистидиновый буфер. В некоторых осуществлениях гистидин присутствует в концентрации от $5 \text{ mM} \pm 0,75 \text{ mM}$ до $15 \text{ mM} \pm 2,25 \text{ mM}$; от $6 \text{ mM} \pm 0,9$
 15 mM до $14 \text{ mM} \pm 2,1 \text{ mM}$; от $7 \text{ mM} \pm 1,05 \text{ mM}$ до $13 \text{ mM} \pm 1,95 \text{ mM}$; от $8 \text{ mM} \pm 1,2 \text{ mM}$ до $12 \text{ mM} \pm 1,8 \text{ mM}$; от $9 \text{ mM} \pm 1,35 \text{ mM}$ до $11 \text{ mM} \pm 1,65 \text{ mM}$; $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$; или примерно 10 mM. В некоторых осуществлениях буферная система содержит гистидин в концентрации $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ при pH of $6,0 \pm 0,3$.

Фармацевтические составы настоящего изобретения могут также содержать
 20 одно или несколько вспомогательных веществ, которые служат для поддержания низкой вязкости или для снижения вязкости препаратов, содержащих высокие концентрации лекарственного вещества на основе антитела анти-PCSK9 (например, как правило, $> 150 \text{ мг/мл}$ антитела). В некоторых осуществлениях состав включает аргинин в количествах, достаточных для поддержания вязкости
 25 жидкого состава на уровне менее $20 \pm 3 \text{ сПз}$, менее $15 \pm 2,25 \text{ сПз}$ или менее $11 \pm 1,65 \text{ сПз}$. В некоторых осуществлениях препараты содержат аргинин в количестве, достаточном для поддержания вязкости на уровне не выше $10,6 \pm 1,59 \text{ сПз}$. В

некоторых осуществлениях фармацевтический состав настоящего изобретения содержит аргинин, предпочтительно в форме гидрохлорида L-аргинина в концентрации от $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ до $90 \text{ mM} \pm 13,5 \text{ mM}$, от $20 \text{ mM} \pm 3 \text{ mM}$ до $80 \text{ mM} \pm 12 \text{ mM}$, от $30 \text{ mM} \pm 4,5 \text{ mM}$ до $70 \text{ mM} \pm 10,5$, от $40 \text{ mM} \pm 6 \text{ mM}$ до $60 \pm 9 \text{ mM}$ или $50 \text{ mM} \pm 7,5 \text{ mM}$.

ПРИМЕРЫ СОСТАВОВ

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения фармацевтический состав представляет собой, как правило, физиологически изотонический жидкий состав с низкой вязкостью, который содержит: (i) человеческое антитело, которое специфически связывается с человеческой PCSK9 (например mAb-316P), в концентрации $50 \text{ мг/мл} \pm 7,5 \text{ мг/мл}$, $100 \text{ мг/мл} \pm 15 \text{ мг/мл}$, $150 \text{ мг/мл} \pm 22,5 \text{ мг/мл}$ или $175 \text{ мг/мл} \pm 26,25 \text{ мг/мл}$; (ii) буферную систему, которая поддерживает pH примерно на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахар, который также служит термическим стабилизатором; (iv) органический вспомогательный растворитель, который защищает структурную целостность антитела; и (v) соль аминокислоты, которая служит для поддержания достаточно низкой вязкости для инъекции подходящего объема для подкожного введения.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит замещенную тяжелую цепь вариабельной области типа IGHV3-23 и замещенную легкую цепь вариабельной области типа IGLV4-1 (например mAb-316P) в концентрации от примерно $50 \pm 7,5 \text{ мг/мл}$ до примерно $175 \pm 26,25 \text{ мг/мл}$; (ii) буферную систему, содержащую гистидин, которая поддерживает pH примерно на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу; (iv) неионогенный детергент, например полисорбат; и в некоторых случаях (v) соль аргинина.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO:2, HCDR2 из SEQ ID NO:3, HCDR3 из SEQ ID NO:4, LCDR1 из SEQ ID NO:6, LCDR2 из SEQ ID NO:7, а также LCDR3 из SEQ ID NO:8, в концентрации $175 \pm 26,25$ мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$, который обеспечивает pH на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации $5\% \text{ вес/об} \pm 0,75\% \text{ вес/об}$; (iv) полисорбат 20 в концентрации $0,01\% \text{ вес/об} \pm 0,0015\% \text{ вес/об}$; и (v) гидрохлорид L-аргинина в концентрации $50 \text{ mM} \pm 7,5 \text{ mM}$.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO:2, HCDR2 из SEQ ID NO:3, HCDR3 из SEQ ID NO:4, LCDR1 из SEQ ID NO:6, LCDR2 из SEQ ID NO:7, а также LCDR3 из SEQ ID NO:8, в концентрации $150 \pm 22,5$ мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$, который обеспечивает pH на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации $10\% \text{ вес/об} \pm 1,5\% \text{ вес/об}$; и (iv) полисорбат 20 в концентрации $0,2\% \text{ вес/об} \pm 0,03\% \text{ вес/об}$ или $0,01\% \text{ вес/об} \pm 0,0015\% \text{ вес/об}$.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO:2, HCDR2 из SEQ ID NO:3, HCDR3 из SEQ ID NO:4, LCDR1 из SEQ ID NO:6, LCDR2 из SEQ ID NO:7, а также LCDR3 из SEQ ID NO:8, в концентрации примерно 100 ± 15 мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $20 \text{ mM} \pm 3 \text{ mM}$, который обеспечивает pH на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации $12\% \text{ вес/об} \pm 1,8\% \text{ вес/об}$; и (iv) полисорбат 20 в концентрации $0,2\% \text{ вес/об} \pm 0,03\% \text{ вес/об}$ или $0,01\% \text{ вес/об} \pm 0,0015\% \text{ вес/об}$.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает

человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO:2, HCDR2 из SEQ ID NO:3, HCDR3 из SEQ ID NO:4, LCDR1 из SEQ ID NO:6, LCDR2 из SEQ ID NO:7, а также LCDR3 из SEQ ID NO:8, в концентрации $50 \pm 7,5$ мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$, который обеспечивает pH на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации 6% вес/об $\pm 0,9\%$ вес/об; и (iv) полисорбат 20 в концентрации 0,1% вес/об $\pm 0,015\%$ вес/об или 0,01% вес/об $\pm 0,0015\%$ вес/об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO:1 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO:5 в концентрации $175 \pm 26,25$ мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$, который обеспечивает pH на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации 5% вес/об $\pm 0,75\%$ вес/об; (iv) полисорбат 20 в концентрации 0,01% вес/об $\pm 0,0015\%$ вес/об; и (v) гидрохлорид L-аргинина в концентрации $50 \text{ mM} \pm 7,5 \text{ mM}$.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO:1 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO:5 в концентрации примерно $150 \pm 22,5$ мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$, который обеспечивает pH на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации 10% вес/об $\pm 1,5\%$ вес/об; и (iv) полисорбат 20 в концентрации 0,2% вес/об $\pm 0,03\%$ вес/об или 0,01% вес/об $\pm 0,0015\%$ вес/об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO:1 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO:5 в концентрации примерно 100 ± 15 мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $20 \text{ mM} \pm 3 \text{ mM}$, который

обеспечивает на уровне pH $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации 12% вес/об $\pm 1,8\%$ вес/об; и (iv) полисорбат 20 в концентрации 0,2% вес/об $\pm 0,03\%$ вес/об или 0,01% вес/об $\pm 0,0015\%$ вес/об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав

5 содержит: (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит вариабельную область тяжелой цепи из SEQ ID NO:1 и вариабельную область легкой цепи из SEQ ID NO:5 в концентрации примерно $50 \pm 7,5$ мг/мл; (ii) гистидин в концентрации $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$, который обеспечивает pH на уровне $6,0 \pm 0,3$; (iii) сахарозу в концентрации 6% вес/об $\pm 0,9\%$ вес/об; и (iv) полисорбат 20 в концентрации 0,1% вес/об $\pm 0,015\%$ вес/об или

10 0,01% вес/об $\pm 0,0015\%$ вес/об.

Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтических составов, входящих в сферу охвата настоящего изобретения, раскрываются в других разделах настоящего документа, в том числе в демонстрационных примерах,

15 приведенных ниже.

СТАБИЛЬНОСТЬ И ВЯЗКОСТЬ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ

Фармацевтические составы настоящего изобретения, как правило, отличаются высокими уровнями стабильности. Термин «стабильный», который используется в настоящем документе в отношении фармацевтических составов,

20 означает, что антитела в фармацевтических составах сохраняют приемлемый уровень химической структуры или биологической функции после хранения в определенных условиях. Состав может быть стабильным, даже несмотря на то что содержащееся в нем антитело не сохраняет 100% своей химической

25 структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. В определенных обстоятельствах сохранение примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%

структуры или функции антитела после хранения в течение определенного периода времени может рассматриваться как «стабильность».

Стабильность, кроме прочего, может измеряться по определяемому проценту нативного антитела, который остается в составе после хранения в течение

5 определенного периода времени при определенной температуре. Процент нативного антитела может определяться, среди прочего, с помощью

экслюзионной хроматографии (например высокоэффективной жидкостной

экслюзионной хроматографии [экслюзионная ВЭЖХ]), при этом под нативным

10 понимается неагрегированное и неразложившееся антитело. Используемое в настоящем документе выражение «приемлемый уровень стабильности» означает,

что после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре в препарате может обнаруживаться по крайней мере 90% нативной

формы антитела. В некоторых осуществлениях после хранения в течение

определенного времени при определенной температуре в препарате можно

15 зарегистрировать по крайней мере примерно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нативной формы антитела. Заданный период

времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по

крайней мере 14 дней, по крайней мере 28 дней, по крайней мере 1 месяц, по

крайней мере 2 месяца, по крайней мере 3 месяца, по крайней мере 4 месяца, по

20 крайней мере 5 месяцев, по крайней мере 6 месяцев, по крайней мере 7 месяцев, по крайней мере 8 месяцев, по крайней мере 9 месяцев, по крайней мере 10

месяцев, по крайней мере 11 месяцев, по крайней мере 12 месяцев, по крайней

мере 18 месяцев, по крайней мере 24 месяцев или более. Заданной

температурой, при которой может храниться фармацевтический состав при

25 определении стабильности, может быть любая температура от примерно -80°C до

примерно 45°C, например, хранение примерно при -80°C, примерно -30°C,

примерно -20°C, примерно 0°C, примерно 4°-8°C, примерно 5°C, примерно 25°C,

примерно 35°C, примерно 37°C или примерно 45°C. Например, фармацевтический

- состав может считаться стабильным, если через 6 месяцев хранения при 5°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 95%, 96%, 97% или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через 6 месяцев хранения при 25°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 94%, 95%, 96%, 97% или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через 28 дней хранения при 45°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при -20°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 96%, 97% или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при -30°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 96%, 97% или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при -80°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 96%, 97% или 98% нативного антитела.

- Стабильность, кроме прочего, может измеряться по определяемому проценту антитела, которое образует агрегаты в составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре, причем стабильность обратно пропорциональна проценту образовавшегося агрегата. Процент агрегированного антитела может определяться, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии [эксклюзионная ВЭЖХ]). Используемое в настоящем документе выражение «приемлемый уровень стабильности» означает, что после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре в препарате может обнаруживаться не больше 6% антитела в агрегированной форме. В некоторых осуществлениях после хранения

в течение определенного времени при определенной температуре в препарате может регистрироваться не больше примерно 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% агрегированного антитела. Заданный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по крайней мере 2 недели, по крайней мере 28 дней, по крайней мере 1 месяц, по крайней мере 2 месяца, по крайней мере 3 месяца, по крайней мере 4 месяца, по крайней мере 5 месяцев, по крайней мере 6 месяцев, по крайней мере 7 месяцев, по крайней мере 8 месяцев, по крайней мере 9 месяцев, по крайней мере 10 месяцев, по крайней мере 11 месяцев, по крайней мере 12 месяцев, по крайней мере 18 месяцев, по крайней мере 24 месяцев или более. Заданной температурой, при которой может храниться фармацевтический состав при определении стабильности, может быть любая температура от примерно -80°C до примерно 45°C, например, хранение примерно при -80°C, примерно -30°C, примерно -20°C, примерно 0°C, примерно 4°C, примерно 8°C, примерно 5°C, примерно 25°C, примерно 35°C, примерно 37°C или примерно 45°C. Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при 5°C регистрируется менее чем примерно 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела в агрегированной форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при 25°C регистрируется менее чем примерно 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела в агрегированной форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через 28 дней хранения при 45°C регистрируется менее чем примерно 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела в агрегированной форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через три месяца хранения при -20°C, -30°C или -80°C регистрируется менее чем примерно 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела в агрегированной форме.

Стабильность, кроме прочего, может измеряться по определяемому проценту антитела, которое переходит в более кислую фракцию в процессе ионного обмена

(«кислая форма»), по сравнению с главной фракцией антитела («главная заряженная форма»), причем стабильность обратно пропорциональна доле антитела в кислой форме. Не накладывая какие-либо теоретические ограничения, можно отметить, что деамидирование антитела может привести к повышению отрицательного заряда антитела, а значит, к его более высокой кислотности по сравнению с недеамидированным антителом (см., например, Robinson, N., Protein Deamidation, *PNAS*, April 16, 2002, 99(8):5283-5288). Процент «подкисленного» антитела можно определять, среди прочего, с помощью ионообменной хроматографии (например высокоэффективной жидкостной катионообменной хроматографии [катионообменная ВЭЖХ]). Используемое в настоящем документе выражение «приемлемый уровень стабильности» означает, что после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре в препарате может обнаруживаться не более 49% антитела в более кислой форме. В некоторых осуществлениях приемлемый уровень стабильности означает, что после хранения в течение определенного времени при определенной температуре в препарате может регистрироваться не более примерно 49%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела в кислой форме. Заданный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по крайней мере 2 недели, по крайней мере 28 дней, по крайней мере 1 месяц, по крайней мере 2 месяца, по крайней мере 3 месяца, по крайней мере 4 месяца, по крайней мере 5 месяцев, по крайней мере 6 месяцев, по крайней мере 7 месяцев, по крайней мере 8 месяцев, по крайней мере 9 месяцев, по крайней мере 10 месяцев, по крайней мере 11 месяцев, по крайней мере 12 месяцев, по крайней мере 18 месяцев, по крайней мере 24 месяцев или более. Заданной температурой, при которой можно хранить фармацевтический состав при определении стабильности, может быть любая температура от примерно -80°C до примерно 45°C, например, хранение примерно при -80°C, примерно -30°C, примерно -20°C, примерно 0°C, примерно 4°-8°C,

примерно 5°C, примерно 25°C или примерно 45°C. Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при -80°C, -30°C или -20°C менее чем примерно 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела оказывается в более кислой форме.

5 Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при 5°C менее чем примерно 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела оказывается в

10 более кислой форме. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при 25°C менее чем примерно 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела оказывается в

15 более кислой форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через 28 дней хранения при 45°C менее чем примерно 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела оказывается в более кислой форме.

20

Для оценки стабильности составов настоящего изобретения могут использоваться и другие методы, например дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), для определения термической стабильности, контролируемое встряхивание для определения механической стабильности и

25 поглощение примерно при 350 нм или примерно при 405 нм для определения мутности раствора. Например, состав настоящего изобретения может считаться стабильным, если через 6 или более месяцев хранения при температуре от примерно 5°C до примерно 25°C изменение OD₄₀₅ состава будет менее примерно

0,05 (например 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) по сравнению с OD₄₀₅ состава в начальный момент времени.

Измерение биологической активности или аффинности связывания антитела с его мишенью также может использоваться для оценки стабильности. Например, состав настоящего изобретения может считаться стабильным, если после хранения при, например, 5°C, 25°C, 45°C, и пр. в течение определенного периода времени (например от 1 до 12 месяцев) антитело анти-PCSK9, которое содержится в составе, связывается с PCSK9 с аффинностью, которая составляет по крайней мере 90%, 95% или более от аффинности связывания антитела до упомянутого хранения. Аффинность связывания может определяться, например, с помощью ELISA или плазмонного резонанса. Биологическая активность может определяться по анализу активности PCSK9, например, взаимодействию клетки, которая экспрессирует PCSK9, с составом, содержащим антитело анти-PCSK9. Связывание антитела с такой клеткой может измеряться напрямую, например с помощью анализа FACS. В альтернативном варианте последующая активность системы PCSK9 может измеряться в присутствии антитела и сопоставляться с активностью системы PCSK9 в отсутствие антитела. В некоторых осуществлениях PCSK9 может быть эндогенной для клетки. В других осуществлениях PCSK9 может эктопически экспрессироваться в клетке.

Дополнительные способы оценки стабильности антитела в составе изложены в примерах, представленных ниже.

Жидкие фармацевтические препараты настоящего изобретения в некоторых осуществлениях могут отличаться низкими или средними уровнями вязкости. Используемый в настоящем документе термин «вязкость» относится к «кинематической вязкости» или «абсолютной вязкости». «Кинематическая вязкость» является показателем резистивного течения жидкости под действием силы тяжести. Если две жидкости равного объема поместить в одинаковые капиллярные вискозиметры и позволить им вытекать под действием силы

тяжести, то для прохождения через капилляр вязкой жидкости потребуется больше времени, чем жидкости с меньшей вязкости. Например, если одной жидкости для полного вытекания потребуется 200 секунд, а другой жидкости требуется 400 секунд, то вторая жидкость считается вдвое более вязкой по сравнению с первой по шкале кинематической вязкости. «Абсолютная вязкость», которую иногда называют динамической или простой вязкостью, представляет собой произведение кинематической вязкости и плотности жидкости (абсолютная вязкость = кинематическая вязкость $\times$ плотность). Размерность кинематической вязкости — L^2/T , где L — длина, а T — время. Кинематическая вязкость обычно выражается в сантистоксах (сСт). Единицей кинематической вязкости в системе СИ является $\text{мм}^2/\text{с}$, равная 1 сСт. Абсолютная вязкость выражается в сантипуазах (сПз). В системе СИ единицей абсолютной вязкости является миллипаскаль-секунда (мПа-с), где 1 сПз = 1 мПа-с.

Используемая в настоящем документе характеристика низкого уровня вязкости в отношении жидкого состава настоящего изобретения будет соответствовать абсолютной вязкости менее примерно 15 сПз. Например, жидкий состав настоящего изобретения будет иметь «низкую вязкость», если при регистрации с помощью стандартных методик измерения вязкости состав оказывается имеющим абсолютную вязкость примерно 15 сПз, примерно 14 сПз, примерно 13 сПз, примерно 12 сПз, примерно 11 сПз, примерно 10 сПз, примерно 9 сПз, примерно 8 сПз или менее. Используемая в настоящем документе характеристика среднего уровня вязкости в отношении жидкого состава настоящего изобретения будет соответствовать абсолютной вязкости в интервале между примерно 35 сПз и примерно 15 сПз. Например, жидкий состав настоящего изобретения будет иметь «среднюю вязкость», если при регистрации с помощью стандартных методик измерения вязкости состав оказывается имеющим абсолютную вязкость примерно 34 сПз, примерно 33 сПз, примерно 32 сПз, примерно 31 сПз, примерно 30 сПз, примерно 29 сПз, примерно 28 сПз, примерно 27 сПз, примерно 26 сПз, примерно

25 сПз, примерно 24 сПз, примерно 23 сПз, примерно 22 сПз, примерно 21 сПз, примерно 20 сПз, примерно 19 сПз, 18 сПз, примерно 17 сПз, примерно 16 сПз или примерно 15,1 сПз.

Как явствует из приведенных ниже примеров, авторы настоящего изобретения
5 неожиданно обнаружили, что при добавлении в состав антитела аргинина в концентрации от примерно 25 мМ до примерно 100 мМ можно получить жидкие составы с вязкостью от низкой до средней, содержащие высокие концентрации античеловеческого антитела PCSK9 (например от примерно 100 мг/мл до по крайней мере 200 мг/мл). Кроме того, было также обнаружено, что вязкость
10 состава можно будет снизить в еще большей степени за счет снижения содержания сахарозы до менее чем примерно 10%.

КОНТЕЙНЕРЫ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

Фармацевтические составы настоящего изобретения можно помещать в любой контейнер, пригодный для хранения лекарств и других лекарственных препаратов.
15 Например, фармацевтические составы можно помещать в герметичный и стерилизованный пластиковый или стеклянный контейнер с определенным объемом, например флакон, ампулу, шприц, картридж или бутылку. Для хранения составов настоящего изобретения могут использоваться различные типы флаконов, в том числе, например, прозрачные и непрозрачные (например
20 янтарного цвета) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогичным образом, для хранения или введения фармацевтического состава настоящего изобретения могут использоваться шприцы любого типа.

Фармацевтические составы настоящего изобретения можно помещать в шприцы с «обычным содержанием вольфрама» или шприцы с «низким
25 содержанием вольфрама». Специалистам в области будет очевидно, что процесс изготовления стеклянных шприцев обычно предполагает использование горячего вольфрамового стержня для формирования отверстия в стекле, через которое

будут набираться и подаваться жидкости. Такой процесс приводит к отложению следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца.

Последующая промывка и другие производственные стадии могут использоваться для снижения содержания вольфрама в шприце. Используемый в настоящем

5 документе термин «обычное содержание вольфрама» означает, что шприц содержит не менее 500 миллиардных долей вольфрама. Термин «низкое содержание вольфрама» означает, что шприц содержит менее 500 миллиардных долей вольфрама. Например, в соответствии с настоящим изобретением шприц с низким содержанием вольфрама содержит менее примерно 490, 480, 470, 460,
10 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или меньше миллиардных долей вольфрама.

Резиновые поршни, используемые в шприцах, а также резиновые пробки, которыми закрывают флаконы, могут иметь покрытие для предотвращения загрязнения лекарственного содержимого шприца или флакона, или же для
15 обеспечения его стабильности. Таким образом, фармацевтические составы настоящего изобретения в соответствии с определенными осуществлениями можно помещать в шприц с покрытым поршнем или же во флакон, который закупоривается резиновой пробкой с покрытием. Например, поршень или пробку можно покрывать пленкой фторуглеводородов. Примеры пробок или поршней с
20 покрытием, пригодных для использования с флаконами и шприцами, содержащими фармацевтические составы настоящего изобретения, приводятся, например, в патентах США №№ 4,997,423; 5,908,686; 6,286,699; 6,645,635 и 7,226,554, содержание которых в силу ссылки на них полностью включается в текст настоящего документа. Конкретные примеры резиновых пробок и поршней с
25 покрытием, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, серийно выпускаются под торговой маркой «FluroTec®», поставляемой West Pharmaceutical Services, Inc. (Лайонвилль, штат Пенсильвания). FluroTec® является примером фторуглеводородного покрытия, которое используется, чтобы

свести к минимуму или предотвратить налипание лекарственного вещества на резиновые поверхности.

В соответствии с определенными осуществлениями настоящего изобретения фармацевтические составы можно помещать в шприц с низким содержанием вольфрама и поршнем с фторуглеродным покрытием.

Фармацевтические составы могут вводиться пациенту парентерально, например посредством инъекции (например подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно и пр.), или посредством чрескожного, чрезслизистого, назального, ингаляционного или перорального введения. Для подкожного введения фармацевтического состава настоящего изобретения могут применяться самые различные конструкции многоразовых шприцов-ручек и устройств для автоматической инъекции. К примерам, среди прочего относятся AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, штат Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручка BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия). К примерам разовых шприцов-ручек или устройств для автоматической инъекции, которые могут применяться для подкожного введения фармацевтического состава настоящего изобретения, среди прочих, относятся шприц-ручка SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоматическое устройство SURECLICK™ (Amgen, Таусенд-Оакс, штат Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штуттгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручка HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, штат Иллинойс).

Также возможно использовать микроинжектор для доставки фармацевтических составов настоящего изобретения. Используемый в настоящем документе термин

«микроинжектор» означает устройство для подкожного введения, предназначенное для медленного вливания больших объемов (например до 2,5 мл и выше) лекарственного состава в течение продолжительного периода времени (например примерно 10, 15, 20, 25, 30 или более минут). См., например, 5 U.S. 6,629,949; US 6,659,982; а также Meehan *et al.*, *J. Controlled Release* 46:107-116 (1996). Микроинжекторы особенно удобны для доставки больших доз лекарственных белков, содержащихся в высоких концентрациях (например примерно 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл), или вязких растворов.

В одном осуществлении жидкий фармацевтический препарат, содержащий 10 примерно 175 мг/мл $\pm$ 26,25 мг/мл антитела анти-PCSK9 вводится подкожно в объеме примерно 1,14 мл $\pm$ 0,17 мл в предварительно заполненном шприце. В одном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц объемом 1 мл с тонкостенной иглой размером 27-G, с поршнем из резины с фторуглеродородным покрытием и резиновым колпачком иглы. В одном 15 осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц OMPI объемом 1 мл с иглой размером 27-G, с резиновым колпачком иглы FM27 и поршнем из резины с покрытием FLUROTEC® 4023/50.

В одном осуществлении жидкий фармацевтический препарат, содержащий примерно 150 мг/мл $\pm$ 22,5 мг/мл антитела анти-PCSK9 вводится подкожно в 20 объеме примерно 1 мл $\pm$ 0,15 мл в предварительно заполненном шприце. В одном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц объемом 1 мл с тонкостенной иглой размером 27-G, с поршнем из резины с фторуглеродородным покрытием и резиновым колпачком иглы. В одном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц 25 OMPI объемом 1 мл с иглой размером 27-G, с резиновым колпачком иглы FM27 и поршнем из резины с покрытием FLUROTEC® 4023/50.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ

- Фармацевтические составы настоящего изобретения, среди прочего, применяются для лечения, профилактики или смягчения симптомов любого заболевания или нарушения, связанного с активностью PCSK9, в том числе заболеваний или нарушений, опосредованных PCSK9. К примерам
- 5 неограничивающих заболеваний и нарушений, которые можно излечивать или предупредить посредством введения фармацевтических составов настоящего изобретения, относятся различные дислипидемии, например гиперхолестеринемия, наследственная гиперхолестеринемия, гиперлипидемия, наследственная гиперлипидемия, дисбеталипопротеинемия, наследственная
- 10 дисбеталипопротеинемия, гипертриглицеридемия и наследственная гипертриглицеридемия.

ПРИМЕРЫ

- Приведенные ниже примеры призваны дать специалистам в области полное раскрытие информации и описание того, как следует формулировать и
- 15 использовать способы и препараты настоящего изобретения, и не призваны ограничивать сферу охвата того, что изобретатели рассматривают как предмет своего изобретения. Были приложены все усилия обеспечить точность в отношении используемых показателей (например количеств, температуры и пр.), но необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.
- 20 Если не указано иное, под частями понимаются части в молях, молекулярным весом называют усредненный молекулярный вес, температура приводится в градусах Цельсия, а давление находится на уровне атмосферного или близко к этому уровню.

- Начальные этапы разработки состава включали скрининг органических
- 25 вспомогательных растворителей, термических стабилизаторов и буферов в жидких и лиофилизированных составах mAb-316P (антител анти-PCSK9 изобретения), чтобы определить вспомогательные вещества, совместимые с

белком и повышающие его стабильность, одновременно поддерживая близкую к физиологической осмоляльность и низкую вязкость для внутривенного и подкожного введения. Анализировали также буферные условия, чтобы определить оптимальный pH для максимальной стабильности белка.

5 ПРИМЕР 1: Разработка СОСТАВА АНТИ-PCSK1 MAB-316P

Проводили скрининг различных буферов, органических вспомогательных растворителей и термических стабилизаторов для выявления вспомогательных веществ, которые повышают стабильность антитела PCSK9. Анализировали также буферные условия, чтобы определить оптимальный pH для максимальной

10 стабильности антитела. Результаты этих исследований использовали для разработки стабильного жидкого состава, а также стабильного лиофилизованного состава, пригодного для клинического использования как при внутривенном (в/в), так и подкожном (п/к) введении. В случае лиофилизованного лекарства был разработан один состав для двойного применения, который можно разводить

15 стерильной водой для инъекций (ВДИ) до концентрации либо 50 мг/мл для в/в или 100 мг/мл для п/к введения. После разведения до 50 мг/мл лекарство можно дополнительно разбавлять в пакете для в/в вливания, содержащем 0,9% хлорида натрия для в/в инъекций. Для жидкого состава концентрация mAb-316P готовили

20 175 ± 27 мг/мл и 150 ± 23 мг/мл. В одном осуществлении 175 ± 27 мг/мл mAb-316P готовили в $10 \pm 1,5$ mM гистидине (pH $6,0 \pm 0,3$), $0,01\% \pm 0,0015\%$ полисорбате 20, $5\% \pm 0,75\%$ сахарозе. В одном осуществлении 150 ± 23 мг/мл mAb-316P готовили в $10 \pm 1,5$ mM гистидине (pH $6,0 \pm 0,3$), $0,2\% \pm 0,03\%$ или $0,01\% \pm 0,0015\%$ полисорбате 20, $10\% \pm 1,5\%$ сахарозе.

ПРИМЕР 2: БУФЕР И pH АНТИ-PCSK1 MAB-316P

25 Для жидких растворов изучали воздействие pH и типа буфера на стабильность антител PCSK9. 2 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P инкубировали при 45°C в одном из

следующих 10 мМ буферов: ацетатный (pH 5,0-5,5), цитратный (pH 5,5-6,0),
сукцинатный (pH 6,0), гистидиновый (pH 6,0), фосфатный (pH 6,0-7,5) или Tris (pH
8,0) для оценки воздействия буфера и pH на термическую стабильность белка
(таблица 1). Для этого эксперимента каждый из жидких составов объемом 0,35 мл
5 помещали во флакон емкостью 2 мл из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой
из бутилкаучука с покрытием FLUROTec® 4432/50. Общее выделенное
количество mAb-316P определяли с использованием обращеннофазовой
хроматографии. Процент нативной формы mAb-316P по сравнению с
агрегированной определяли с помощью эксклюзионной хроматографии. Процент
10 кислых и основных форм mAb-316P определяли с помощью катионообменной
хроматографии. Максимальную стабильность белка отслеживали по данным
эксклюзионной хроматографии (ЭХ) и катионообменной хроматографии (КОХ) для
состава анти-PCSK9 mAb-316P в 10 мМ гистидиновом буфере при pH 6,0.

Оптимальный pH для mAb-316P затем определяли инкубированием 10 мг/мл
15 mAb-316P при 45°C в гистидиновом буфере в интервале от pH 5,5 до pH 6,5.
Максимальную стабильность белка отслеживали по ЭХ и КОХ для составов mAb-
316P в гистидиновом буфере при pH 6,0 (таблица 2). Результаты проведенных
анализов показали, что основные пути распада белка связаны с образованием
агрегатов, продуктов разложения и различных зарядовых форм. На основании
20 полученных результатов для подготовки жидких и лиофилизированных составов
mAb-316P выбрали 10 мМ гистидиновый буфер при pH 6,0.

Результаты исследований вариантов состава показывают, что в основных
условиях (pH $\geq$ 6,5) анти-PCSK9 mAb-316P в растворе может подвергаться
деамидированию. Напротив, при pH $\leq$ 5,5 наблюдалась повышенная скорость
25 образования вариантов молекулярного веса mAb-316P. На основании этих данных
pH буфера, используемого для состава mAb-316P, поддерживается в интервале

между pH 5,7 и pH 6,3. Для ускоренных исследований стабильности mAb-316P в этом интервале pH получены аналогичные результаты.

ПРИМЕР 3: ВЫБОР СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ ОТ СТРЕССА ПРИ ВСТРЯХИВАНИИ

Раздельно изучали различные вспомогательные растворители по их способности сводить к минимуму образование частиц в смесях, содержащих mAb-316P из-за стресса при встряхивании. Анализ мутности лекарственного препарата при встряхивании показал увеличение оптической плотности (OD) при 405 нм после 120 минут встряхивания раствора, содержащего mAb-316P (0,35 мл 25 мг/мл раствора mAb-316P, 10 mM гистидина, pH 6,0 ± 0,2 во флаконе из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с пробкой из бутылкаучука с покрытием FLUROTEC® 4432/50) (таблица 3). Состав со всеми изученными вспомогательными растворителями препятствовал повышению мутности из-за встряхивания. При этом 20% PEG 300, 10% PEG 300 и 20% пропиленгликоля значительно снижали термическую стабильность mAb-316P по данным ЭХ (таблица 4; та же концентрация mAb-316P, буфер и емкость, что и в приведенном выше исследовании встряхивания). Составы с полисорбатом 20, полисорбатом 80, Pluronic F68 и PEG 3350 по результатам ЭХ и КОХ не оказывали заметного эффекта на термическую стабильность mAb-316P, что делает указанные вспомогательные растворители пригодными для использования в составах анти-PCSK9 mAb-316P. Полисорбат 20 выбирали в качестве органического вспомогательного растворителя для подготовки лиофилизированных и жидких составов mAb-316P, поскольку при этом удавалось обеспечить высокие характеристики стабильности при встряхивании и исследовании термической стабильности mAb-316P.

ПРИМЕР 4: ВЫБОР СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ ОТ ТЕРМИЧЕСКОГО СТРЕССА

Раздельно анализировали различные вспомогательные вещества, которые выбирали из перечня, включающего сахара, аминокислоты и неорганические соли, для оптимального увеличения термической стабильности mAb-316P.

Итоговая информация по некоторым термическим стабилизаторам, которые
5 включали в исследование, приводится в таблице 5. Для этих экспериментов вспомогательные «термические стабилизаторы» добавляли в раствор 20 мг/мл mAb-316P в 10 мМ гистидине (0,35 мл во флаконе из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с пробкой из бутилкаучука с покрытием FLUROTec® 4432/50). По результатам ЭХ анализа составы, содержащие сахарозу, сорбитол, маннитол и
10 трегалозу демонстрировали наименьшую степень распада mAb-316P. При этом в составах с сорбитолом наблюдалось неожиданное увеличение мутности по сравнению с составами, содержащими сахарозу, трегалозу и маннитол (таблица 5). Несмотря на то что для сахарозы, трегалозы и маннитола не наблюдалось никакого воздействия на образование различных зарядовых форм анти-PCSK9
15 mAb-316P, оказалось, что маннитол дестабилизирует белок в ходе нескольких циклов замораживания-оттаивания. Таким образом, стабильность mAb-316P в составах с сахарозой и трегалозой была приблизительно одинаковой.

ПРИМЕР 5: ЛИОФИЛИЗОВАННЫЙ СОСТАВ

Был разработан лиофилизированный состав для повышения стабильности анти-
20 PCSK9 mAb-316P, в частности по отношению к различным зарядовым формам, и для увеличения максимальных доставляемых концентраций mAb-316P.

Различные лиопротекторы добавляли к 0,7 мл 50 мг/мл раствора mAb-316P, 10 мМ гистидина во флаконе из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с пробкой из бутилкаучука с покрытием FLUROTec® 4432/50, лиофилизировали и
25 анализировали их способность стабилизировать лиофилизированный mAb-316P при инкубации при 50°C. Перед анализом лиофилизированный остаток разводили до 100 мг/мл mAb-316P. Два лиофилизированных состава с наибольшей стабильностью по

данным ЭХ и КОХ содержали: 1) 6% сахарозы или 2) 2% сахарозы и 2% аргинина.

Для приготовления лекарственного препарата mAb-316P выбрали 6% сахарозы.

Таким образом, лиофилизированный лекарственный препарат на основе анти-PCSK9 mAb-316P получали лиофилизацией оптимизированного забуференного

- 5 водного раствора препарата содержащего 10 мМ гистидина, pH 6,0 ± 0,1, 0,1% (вес/об) полисорбата 20, 6% (вес/об) сахарозы и 50 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P.

Результаты анализа стабильности такого лиофилизированного препарата при хранении и стрессе приводятся в таблице 7.

- 10 Цикл лиофилизации анти-pPCSK9 mAb-316P формировали на основе измеряемой Tg' состава (температура низкотемпературного стеклования), которую определяли с помощью модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии при пониженной температуре окружающей среды (мДСК). При первоначальной сушке температура продукта не должна подниматься выше Tg', которая по результатам измерений составляет -27,9°C.

- 15 Для получения лиофилизированного препарата mAb-316P во флаконы из стекла типа 1 помещали 5,3 мл 50 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина (pH 6,0), 0,1% полисорбата 20, 6% сахарозы и проводили лиофилизацию в следующей последовательности:

- | | | |
|----|---|------------------------------|
| | 1. Температура препарата в процессе загрузки: | <u>5-25°C</u> |
| 20 | 2. Начальное выдерживание: | <u>60 минут при 5°C</u> |
| | 3. Скорость (время) замораживания: | <u>0,5°C/мин (100 минут)</u> |
| | 4. Выдерживание: | <u>120 минут при -45°C</u> |
| | 5. Установка вакуума: | <u>100 мТорр</u> |
| | 6. Скорость (время) нагревания для первичной сушки: | <u>0.5°C/мин (40 минут)</u> |
| 25 | 7. Температура препарата при первичной сушке: | <u>-25°C</u> |
| | 8. Продолжительность первичной сушки: | <u>78 часов</u> |
| | 9. Скорость (время) нагревания для вторичной сушки: | <u>0.2°C/мин (300 минут)</u> |
| | 10. Температура препарата при вторичной сушке: | <u>35°C</u> |

11. Продолжительность вторичной сушки: 6 часов
 12. Скорость (время) охлаждения: 0.5°C/мин (20 минут)
 13. Выдерживание: 60 минут при 25°C*
 14. Заполнение газообразным азотом

- 5 15. Укупорка под вакуумом: 80% атмосферного давления (608 000 мТорр)

Если после вторичной сушки и до момента укупорки требуется продолжительное хранение, температура в лиофилизаторе устанавливается на уровне 2-8°C. Лيوфилизированный лекарственный препарат, который был получен в ходе описанных выше завершающих циклов, имел хороший внешний вид, низкое содержание влаги (0,3%), время растворения меньше 4 минут без признаков мутности разведенного раствора.

Внешний вид лиофилизованного остатка не менялся, если лекарственный препарат mAb-316P (mAb-316P DP) выдерживали 2 месяца при 50°C или хранили 3 месяца при 5°C. Не отмечалось воздействия на pH, внешний вид или мутность разведенного лекарственного препарата mAb-316P, и не отмечалось особых различий в количествах выделенного mAb-316P. Через 2 месяца после инкубации при 50°C лиофилизированный лекарственный препарат mAb-316P был на 1,1% более разложившимся по данным ЭХ ВЭЖХ и на 8,3% более разложившимся по данным КОХ ВЭЖХ. Не отмечалось заметного разложения лиофилизованного лекарственного препарата mAb-316P при хранении в течение 3 месяцев при 5°C. Для всех подвергшихся стрессовому воздействию образцов не отмечалось заметного снижения биологической активности по результатам биопроб анти-PCSK9.

ПРИМЕР 6: ЖИДКИЕ И ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ МАВ-316Р

25 Существует два метода восстановления лиофилизованного лекарственного препарата mAb-316P в зависимости от способа введения. Для в/в введения лекарственный препарат mAb-316P разводят 5,0 мл стерильной ВДИ с

образованием 5,3 мл раствора, содержащего 50 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% (вес/об) полисорбата 20 и 6% (вес/об) сахарозы. Для п/к введения лекарственный препарат mAb-316P разводят 2,3 мл стерильной ВДИ с образованием 2,7 мл раствора, содержащего 100 мг/мл REGN727, 20 мМ

- 5 гистидина, pH 6,0, 0,2% (вес/об) полисорбата 20 и 12% (вес/об) сахарозы. Доступный для отбора объем составляет 4,8 мл для в/в и 2,0 мл для п/к введения; остаток разведенного раствора 0,7 мл оставляют во флаконе для п/к.

- В альтернативном варианте жидкий mAb-316P готовят в виде жидкого препарата без промежуточного этапа лиофилизации. Жидкие препараты mAb-316P имеют концентрацию 150 мг/мл ($\pm 15\%$) или 175 мг/мл ($\pm 15\%$) анти-PCSK9 mAb-316P в $10 \pm 1,5$ мМ гистидине (pH $6,0 \pm 0,3$), полисорбате 20 при $0,01\% \pm 0,0015\%$ или $0,2\% \pm 0,03\%$, сахарозы при $5\% \pm 0,75\%$ или $10\% \pm 1,5\%$, а также в случае состава 175 мг/мл — аргинин при $50 \pm 7,5$ мМ.

Анти-PCSK9 mAb-316P оказался стабильным при стерильном фильтровании.

- 15 Для приготовления клинических препаратов использовали фильтрационную установку Millipore MILLIPAK, а для исследований применяли фильтр аналогичного состава (Millipore MILLEX DURAPORE). По сравнению с хранением в стеклянном флаконе стабильность состава лекарственного препарата mAb-316P (mAb-316P FDS) менялась незначительно при хранении в полипропиленовой
- 20 пробирке, полистирольной пробирке, поликарбонатной пробирке или в стеклянном флаконе со стальным шариковым клапаном (таблица 8).

ПРИМЕР 7: ЖИДКИЕ ПРЕПАРАТЫ В ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ЗАПОЛНЕННЫХ ШПРИЦАХ

- Исследования по разработке состава проводили с целью приготовления
- 25 высококонцентрированных жидких составов mAb-316P, которые могут использоваться в предварительно заполненных шприцах (PFS) для п/к введения. Результаты, полученные на стадии разработки лиофилизованного препарата

REGN727, продемонстрировали, что оптимальным буфером, pH, вспомогательным растворителем и термическим стабилизатором являлись гистидин, pH 6,0, полисорбат 20 и сахароза, соответственно (см. выше). Эти же вспомогательные вещества использовались для разработки составов

5 лекарственных препаратов в концентрации 150 мг/мл и 175 мг/мл mAb-316P. Для снижения вязкости состава к лекарственному препарату в концентрации 175 мг/мл mAb-316P добавляли аргинин. Стабильность при стрессовом воздействии лекарственного препарата 150 и 175 мг/мл mAb-316P изучали в длинных

10 стеклянных шприцах Nuova OMPI емкостью 1 мл с предварительным заполнением (PFS) и сравнивали со стабильностью лекарственного препарата 150 и 175 мг/мл в контрольных стеклянных флаконах. После инкубирования лекарственного препарата 150 или 175 мг/мл mAb-316P при 45°C не наблюдалось различий в физической или химической деградации между OMPI PFS и контрольным

15 стеклянным флаконом. Полученные данные показывают, что составы лекарственных препаратов 150 и 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P достаточно стабильны для использования в PFS.

ПРИМЕР 8: СТАБИЛЬНОСТЬ СОСТАВОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ МАВ-316P

Исследования стабильности проводили для выяснения стабильности при

20 хранении и воздействии стрессовых условий составов 150 и 175 мг/мл mAb-316P. Для оценки физической стабильности mAb-316P использовали анализ мутности и ОФ ВЭЖХ. Физическая стабильность определяется как восстановление растворимых форм анти-PCSK9 mAb-316P в растворе. Потеря белка может быть

25 связана с осаждением белка или поверхностной адсорбцией. Наличие частиц в растворе можно регистрировать визуально или по измерениям оптической плотности (OD) на 405 нм (измерения мутности). В последнем анализе увеличение OD указывает на повышение мутности из-за образования твердых

частиц. Присутствие твердых частиц, регистрируемое по измерениям OD, свидетельствует о том, что образец не в состоянии оставаться стабильным.

Восстановление mAb-316P регистрируется с помощью ОФ ВЭЖХ. При анализе ОФ ВЭЖХ антитело анти-PCSK9 mAb-316P элюируется из обращеннофазовой

5 колонки одним пиком. Концентрация каждого испытываемого образца определялась по площади элюируемого пика антитела mAb-316P по сравнению с данными калибровочной кривой, построенной с использованием стандартов mAb-316P с фиксированной нагрузкой белка.

Химическая стабильность определяется по сохранению химической структуры антитела анти-PCSK9 (mAb-316P) в образце. Химическая нестабильность в
10 значительной мере может быть отнесена к образованию ковалентно модифицированных форм белка (например ковалентных агрегатов, продуктов распада или различных заряженных форм), а также нековалентно модифицированных форм белка (например нековалентных агрегатов). К
15 настоящему времени единственными зарегистрированными продуктами распада mAb-316P были соединения, которые отличаются либо по молекулярному весу, либо по заряду. Продукты распада с более высоким и более низким молекулярным весом можно отделить от нативного mAb-316P с помощью ЭХ ВЭЖХ. Процент нативного mAb-316P в эксклюзионном хроматографическом
20 методе определяется отношением площади нативного пика к суммарной площади всех пиков антитела mAb-316P.

Различные заряженные формы mAb-316P отделяют от нативного mAb-316P с помощью катионообменной хроматографии. Пики, которые элюируются с колонки КОХ ВЭЖХ с временами удерживания до главного пика, маркируются как «кислые пики», а те, которые элюируются с колонки КОХ ВЭЖХ со временами удерживания
25 после главного пика, маркируются как «основные пики». Процент распавшегося mAb-316P в катионнообменном хроматографическом методе определяется

изменением относительного процента площадей главного, кислого и основного пиков по сравнению с суммарной площадью всех пиков mAb-316P.

Оценка mAb-316P в условиях ускоренного исследования стабильности проводилась в рамках воздействия на антитело различных факторов стресса. В таких тестах используются экстремальные условия обращения, в которых состав лекарственного препарата может оказаться в процессе производства лекарства. Состав лекарственного препарата mAb-316P помещали в поликарбонатные флаконы емкостью 5 мл для встряхивания, циклов замораживания/оттаивания и моделирования условий хранения в замороженном состоянии. Для исследования стрессовой стабильности при высоких температурах составы лекарственных препаратов mAb-316P помещали в стеклянные флаконы.

ПРИМЕР 9: ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ СОСТАВОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ (FDS) ПРИ ХРАНЕНИИ

Состав лекарственного препарата 150 мг/мл mAb-316P (FDS; 0,5 мл в 5 мл поликарбонатном флаконе; 150 мг/мл антитела mAb-316P, 10 мМ гистидин (pH 6,0), 0,2% полисорбат 20 и 10% сахарозы) оказался физически и химически стабильным при хранении при $\leq -20^{\circ}\text{C}$ в течение 12 месяцев. По данным эксклюзионной и ионообменной хроматографии не обнаруживалось заметных потерь mAb-316P и заметной химической деградации антитела. Более 97% восстановленного mAb-316P было в «нативной» структуре, как показали результаты эксклюзионной хроматографии, и более 56% восстановленного mAb-316P было в «главной заряженной форме», как показали результаты катионообменной хроматографии. Результаты приводятся в таблице 9.

Состав лекарственного препарата 175 мг/мл mAb-316P (FDS; 0,75 мл в 5 мл поликарбонатном флаконе; 175 мг/мл антитела mAb-316P, 10 мМ гистидин (pH 6,0), 0,01% полисорбат 20 и 5% сахарозы) оказался физически и химически стабильным при хранении при $\leq -20^{\circ}\text{C}$ в течение 3 месяцев. По данным

эксклюзионной и ионообменной хроматографии не обнаруживалось заметных потерь mAb-316P и заметной химической деградации антитела. Более 96% восстановленного mAb-316P было в «нативной» структуре, как показали результаты эксклюзионной хроматографии, и более 56% восстановленного mAb-316P было в «главной заряженной форме», как показали результаты катионообменной хроматографии. Результаты приводятся в таблице 10.

ПРИМЕР 10: ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ СОСТАВОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ СТРЕССОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Исследования стабильности при стрессовом воздействии проводили для состава лекарственного препарата 150 мг/мл mAb-316P (FDS) (0,35 мл – 0,5 мл 150 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина (pH 6,0), 0,2% полисорбата 20, 10% сахарозы) и состава лекарственного препарата 175 мг/мл mAb-316P (0,5 мл – 1,7 мл 175 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина (pH 6,0), 0,01% полисорбата 20, 5% сахарозы, 50 мМ аргинина). Исследования при высокой температуре проводили во флаконах из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с бутилкаучуковой пробкой с покрытием FLUROTEC® 4432/50; остальные исследования проводили в поликарбонатных флаконах емкостью 5 мл. Составы лекарственных препаратов 150 мг/мл и 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P оказались физически и химически стабильными при встряхивании в течение двух часов. Раствор оставался визуально прозрачным, не отмечались потери белка и не образовывались соединения с другим молекулярным весом или различные заряженные формы (таблицы 11 и 12). MAb-316P также оказалось физически и химически стабильным после восьми циклов замораживания до -80°C и оттаивания до комнатной температуры. После восьми циклов замораживания/оттаивания раствор белка оставался на вид прозрачным, и потери белка не регистрировались. Анализ с помощью ЭХ или КОХ не выявил образования соединений с другим

молекулярным весом (растворимые агрегаты или продукты распада) или различных заряженных форм, соответственно.

Несмотря на то что составы лекарственных препаратов 150 и 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P были физически стабильными при инкубировании при 37°C или 45°C в течение 28 дней, тем не менее наблюдалась определенная доля химического распада (таблицы 11 и 12). Результаты испытаний в условиях стрессового воздействия показали, что основные пути распада связаны с образованием агрегатов, продуктов разложения и различных зарядовых форм. Как и ожидалось, скорость распада антитела анти-PCSK9 mAb-316P была медленнее при 37°C, чем при 45°C. Не отмечалось заметных изменений физической или химической стабильности составов лекарственных препаратов 150 или 175 мг/мл mAb-316P при инкубировании в течение 28 дней при температуре 25°C.

ПРИМЕР 11: СТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ ХРАНЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА (DP)

В лекарственном препарате 150 мг/мл mAb-316P содержится 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,01% полисорбата 20, 10% сахарозы и 150 мг/мл антитела анти-PCSK9 mAb-316P. В лекарственном препарате 175 мг/мл mAb-316P содержится 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,01% полисорбата 20, 5% сахарозы, 50 мМ аргинина и 175 мг/мл антитела анти-PCSK9 mAb-316P. Не отмечалось никаких изменений в физической и химической стабильности лекарственного препарата 150 мг/мл или 175 мг/мл mAb-316P (DP) при хранении при 5°C в течение 6 месяцев в предварительно заполненном шприце (PFS; длинный стеклянный шприц OMPi емкостью 1 мл с тонкостенной иглой размера 27 и резиновым защитным колпачком иглы FM27 с резиновым поршнем с покрытием FLUROTEC® 4023/50) (таблица 13 и таблица 14). Растворы сохраняли визуальную прозрачность, не наблюдались потери белка, и после воздействия перечисленных факторов

стресса на отмечалось никаких изменений pH. Кроме того, не регистрировалось существенных изменений в соединениях с различным молекулярным весом или различных зарядовых формах по данным ЭХ и КОХ, соответственно.

5 ПРИМЕР 12: СТАБИЛЬНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА (DP) ПРИ СТРЕССОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Стабильность лекарственных препаратов 150 мг/мл mAb-316P и 175 мг/мл mAb-316P анализировали при инкубировании предварительно заполненных шприцов при 25°C и 45°C. Каждый из соответствующих лекарственных препаратов был физически стабильным при инкубировании в течение 28 дней при 45°C или в
10 течение 6 месяцев при 25°C (таблицы 13 и 14). Растворы сохраняли визуальную прозрачность, не наблюдались потери белка, и после воздействия перечисленных факторов стресса на отмечалось никаких изменений pH. При этом агрегаты и различные заряженные формы регистрировались при инкубировании белка при 45°C и 25°C. Такие стрессовые испытания показывают, что эти пути разложения
15 лекарственного препарата являются основными. Для лекарственного препарата 150 мг/мл доля агрегатов mAb-316P после инкубирования в течение 28 дней при 45°C увеличилась на 1,9%, а доля кислых форм возросла на 19,1%. Снижение уровня химического распада отмечалось при инкубировании белка при 25°C. Отмечалось увеличение относительного количества агрегатов на 0,8%, а кислых
20 форм — на 10,3% через 6 месяцев инкубирования при 25°C. Для лекарственного препарата 175 мг/мл доля агрегатов mAb-316P после инкубирования в течение 28 дней при 45°C увеличилась на 1,8%, а доля кислых форм возросла на 17,0%. Снижение уровня химического распада отмечалось при инкубировании белка при 25°C. Отмечалось увеличение относительного количества агрегатов на 0,7%, а
25 кислых форм — на 9,4% через 6 месяцев инкубирования при 25°C. Для обоих лекарственных препаратов 150 мг/мл и 175 мг/мл доля агрегатов не отмечалось

значительных изменений стабильности mAb-316P после инкубирования в течение 1 месяца при 25°C.

ПРИМЕР 13: ОБЪЕМЫ ЗАПОЛНЕНИЯ

Вводимый объем предварительно заполненного шприца (PFS), содержащего 150 мг/мл лекарственного препарата REGN727 составляет 1,0 мл. Вводимый объем PFS, содержащего 175 мг/мл лекарственного препарата REGN727 составляет 1,14 мл. Ни в один из PFS не включались излишки, поскольку мертвый объем шприца пренебрежимо мал (от 0,005 до 0,01 мл).

ПРИМЕР 14: СТАБИЛЬНОСТЬ MAB-316P ПРИ ХРАНЕНИИ В РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛАХ

Анти-PCSK9 mAb-316P оказался стабильным при стерильном фильтровании. Для исследования и для приготовления клинических препаратов использовали фильтрационную установку MILLIPORE MILLIPAK. По сравнению с хранением в стеклянных флаконах стабильность составов 150 мг/мл и 175 мг/мл лекарственного препарата mAb-316P менялась незначительно при хранении в полипропиленовой пробирке, полистирольной пробирке, поликарбонатной пробирке или в стеклянном флаконе с кольцом из нержавеющей стали (таблица 15 и таблица 16). Несмотря на наблюдаемый распад при инкубировании состава лекарственного препарата при 40°C в течение 14 дней, не наблюдалось существенных различий по степени разложения mAb-316P между контролем, стеклянным флаконом и воздействием пластиковых контейнеров и нержавеющей стали.

ПРИМЕР 15: АНАЛИЗ АНТИТЕЛА АНТИ-PCSK9 MAB-316P

По крайней мере две партии mAb-316P (партия 1 и партия 2) анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии и лазерного светового рассеяния с кратными углами (ЭХ ЛСРКУ) — аналитического метода, который позволяет

оценить молярную массу белка или гликопротеина. Партии 1 и 2 имели соответствующие молярные массы 154,5 и 154,6 кДа. В других партиях молярные массы находились в диапазоне от 154,4 кДа до 154,8 кДа (среднее примерно 155 кДа) для главного пика, который элюировался с носителя ЭХ. На такой главный пик приходилось примерно 96,7–99,2% суммарной площади пика белка, и это соответствует интактному мономеру mAb-316P (то есть «нативному» в соответствии с терминологией настоящего документа).

mAb-316P анализировали капиллярным изoeлектрическим фокусированием (КИЭФ), чтобы определить изoeлектрические точки главных составляющих изоформ. pI и средняя площадь пика (% от суммарной площади пиков) для образцов mAb-316P по данным КИЭФ приведены в таблице 17. В каждой партии присутствовал главный пик (пик 5) с расчетным pI примерно 8,5, который присутствовал в концентрациях 66,4% и 68,0% в партиях 1 и 2, соответственно. Преобладающая форма (пик 5) с наибольшей вероятностью представляет собой интактное, полностью гликозилированное антитело без C-терминального лизина (то есть «главную заряженную форму» в соответствии с терминологией настоящего документа).

Масс-спектрометрический (МС) анализ восстановленных триптических пептидных карт mAb-316P для партии 1 и партии 2 позволил подтвердить наличие единственного сайта гликозилирования, Asn298, в домене Fc обеих партий. Основные ковалентно связанные гликановые формы этого сайта гликозилирования приводятся в таблице 18. В целом, было установлено, что обе партии содержат сложные 2-антенарные гликаны, большинство которых фукозилированы при Asn298. При этом относительное количество фукозилированного агалактозила (G0), содержащего сахарные цепочки, в партии 2 было несколько больше по сравнению с количеством такой гликоформы в партии 1. Напротив, относительные количества фукозилированного дигалактозила (G2) и фукозилированного моногалактозила (G1), содержащие сахарные цепочки в

партии 2 меньше по сравнению с относительными количествами таких сахарных цепочечных структур в партии 1. Анализ результатов ЖХ/МС двух образцов лекарственных препаратов (пик 16) также позволил выявить 2,9% и 8,4% пептида тяжелой цепи без сайта гликана при Asn298 в партии 1 и партии 2,

5 соответственно.

Анализировались профили гликана, полученные с помощью ВЭЖХ после высвобождения олигосахаридов из каждой из двух партий mAb-316P. В каждой хроматограмме производные олигосахаридов подразделялись на две главные группы: нефукозилированные 2-антенарные формы и фукозилированные 2-
 10 антенарные формы. В каждой группе (фукозилированные и нефукозилированные) олигосахариды дополнительно разбивали на дигалактозильные (G2), моногалактозильные (G1) и агалактозильные (G0) формы. Структурные отнесения в олигосахаридах были получены с помощью время-пролетной масс-
 спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией. Интегрирование
 15 каждого пика в двух хроматограммах показало, что уровень фукозилирования в двух партиях mAb-316P был в целом достаточно высоким, при этом в партиях 1 и 2 отмечалось 80,0% и 86,9% фукозилирования.

Несмотря на близкий совокупный процент фукозилирования двух партий, отмечались количественные различия в относительном содержании каждой из
 20 гликановых форм, присутствующих в двух партиях (таблица 19). В партии 1 для фукозилированных гликановых структур G0, G1 и G2 регистрировали процент площадей пиков 34,4%, 39,6% и 11,7%, соответственно. Напротив, процент площадей пиков в партии 2 составлял 45,8%, 33,3% и 7,1% для
 фукозилированных гликоформных структур G0, G1 и G2, соответственно,
 25 указывая на различия в степени галактозилирования между двумя партиями. Пик гликана с высоким содержанием маннозы (гликан man5) (пик 2) регистрировался с относительным содержанием 1,8 – 2,9% по сравнению с общим количеством сахарной цепочки, регистрируемой в обеих партиях (таблица 19). Всего девять

неидентифицированных пиков с процентным соотношением площадей пиков от 0,5% до 1,5% также регистрировалось в обеих партиях, проанализированных таким методом, и они составляют $\leq 3\%$ суммарной площади гликановых пиков, выявленных в каждой партии. Анализ эквимольной смеси двух партий не выявил

5 новых пиков, и процентная доля площадей для всех пиков в смеси хорошо коррелировала с ожидаемыми значениями по результатам раздельного анализа каждой партии (таблица 19).

Таблица 1: Влияние буфера и pH на стабильность mAb-316P при 45°C в течение 28 дней							
pH/буфер	Мутность ¹	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации ²	0,00	1,8	98,1	0,3	57,0	33,0	10,0
pH 8,0, Tris	0,00	1,7	88,9	0,8	15,2	82,4	2,4
pH 8,0, фосфат	0,01	2,0	89,4	1,3	н.д.	н.д.	н.д.
pH 7,5, фосфат	0,01	1,9	91,7	0,9	н.д.	н.д.	н.д.
pH 7,0, фосфат	0,01	2,1	92,4	0,7	16,7	78,8	4,5
pH 6,5, фосфат	0,00	2,0	93,2	0,6	25,0	68,3	6,6
pH 6,0, фосфат	0,00	1,8	93,9	0,3	29,8	62,3	8,0
pH 6,0, гистидин	0,00	1,9	94,5	0,0	36,9	54,0	9,1
pH 6,0, сукцинат	0,00	1,9	93,1	0,4	31,9	59,8	8,3
pH 6,0, цитрат	0,00	1,9	95,1	0,4	32,1	58,1	9,9
pH 5,5, цитрат	0,00	2,1	94,6	0,4	28,0	62,0	9,9
pH 5,5, ацетат	0,00	2,0	92,4	0,2	34,5	56,9	8,5
pH 5,0, ацетат	0,00	1,8	93,0	0,2	31,1	57,5	11,4

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

10 ²Средние значения неинкубированных образцов для всех 12 составов

Таблица 2: Влияние pH на 10 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидин при 45°C в течение 28 дней							
pH/буфер	Мутность ¹	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации ²	0,00	9,5	98,1	0,2	57,8	31,1	11,1
pH 5,5	0,01	9,5	94,3	0,5	34,7	52,2	13,1
pH 6,0	0,01	9,7	94,7	0,9	37,5	51,8	10,6

pH 6,5	0,01	10,1	93,4	1,8	35,7	55,2	9,1
--------	------	------	------	-----	------	------	-----

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

²Средние значения неинкубированных образцов для всех 3 составов

Таблица 3: Влияние вспомогательных растворителей на 25 мг/мл mAb-316P при встряхивании в течение 120 минут							
Органический вспомогательный растворитель	Мутность ¹	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
Без встряхивания ²	0,00	25,6	97,3	0,5	50,6	39,2	10,3
Без вспомогательного растворителя	0,10	25,6	97,3	0,5	51,1	39,0	9,9
0,2% полисорбата 20	0,01	24,7	97,2	0,5	51,1	38,9	10,1
0,2% полисорбата 80	0,01	24,7	97,3	0,5	50,9	38,9	10,2
0,2% Pluronic F68	0,01	25,2	96,9	0,5	50,5	39,2	10,3
3% PEG 3350	0,01	25,3	97,1	0,5	50,7	39,0	10,2
1,5% PEG 3350	0,01	24,9	97,1	0,5	50,8	39,1	10,1
20% PEG 300	0,00	26,7	97,0	0,6	48,8	40,5	10,7
10% PEG 300	0,01	25,7	97,2	0,5	49,9	39,8	10,3
20% пропиленгликоля	0,01	25,8	96,9	0,5	51,1	38,6	10,3

5

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

²Средние значения образцов без встряхивания для всех 9 составов

Таблица 4: Влияние вспомогательных растворителей на 25 мг/мл mAb-316P, инкубированного при 45°C в течение 28 дней								
Органический вспомогательный растворитель	Мутность ¹	pH	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации ²	0,00	6,1	25,6	97,3	0,5	50,6	39,2	10,3
Без вспомогательного растворителя	0,02	6,2	24,9	94,5	0,7	34,8	54,7	10,5
0,2% полисорбата 20	0,03	6,2	24,3	94,6	0,5	35,2	54,3	10,5

0,2% полисорбата 80	0,02	6,2	24,3	94,8	0,6	35,1	54,5	10,4
0,2% Pluronic F68	0,03	6,1	24,6	94,7	0,6	33,8	55,6	10,6
3% PEG 3350	0,03	6,2	24,8	95,0	0,7	35,9	53,5	10,6
1,5% PEG 3350	0,02	6,2	24,4	94,8	0,6	36,0	53,5	10,5
20% PEG 300	0,12	4,8	25,4	88,8	4,2	н.д.	н.д.	н.д.
10% PEG 300	0,09	5,4	25,0	93,7	0,9	24,1	67,0	8,9
20% пропиленглик оля	0,03	6,1	24,6	89,9	5,6	34,6	54,2	11,2

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

²Средние значения образцов без встряхивания для всех 9 составов

Таблица 5: Влияние стабилизатора на 20 мг/мл mAb-316P, 10 mM гистидин при 45°C в течение 28 дней									
Вспомогательное вещество	Визуально	Мутность ¹	pH	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации ²	Годен	0,00	6,0	20,2	97,7	0,5	51,1	39,3	9,6
Без стабилизатора	Годен	0,02	6,1	19,8	93,6	2,0	33,5	56,5	10,1
150 mM NaCl	Негоден	0,03	6,0	20,0	91,0	4,6	35,3	51,0	13,6
20% сахарозы	Годен	0,04	6,0	22,6	94,4	1,0	32,1	57,0	10,9
20% сорбитола	Годен	0,16	5,8	21,8	94,3	1,0	23,5	67,4	9,1
10% маннитола	Годен	0,02	6,0	21,2	94,8	0,9	34,4	54,5	11,1
20% трегалозы	Годен	0,05	6,0	22,7	94,7	0,5	33,2	56,6	10,2
5% глицерина	Годен	0,10	5,9	20,8	90,2	5,4	н.д.	н.д.	н.д.
3% аргинина	Годен	0,02	6,1	21,1	92,9	3,0	37,5	49,2	13,3
3% глицина	Годен	0,03	6,1	19,8	93,7	1,7	31,0	58,0	10,9

5

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

²Средние значения неинкубированных образцов для всех 9 составов

10 Таблица 6: Влияние лиопротекторов на лиофилизированный mAb-316P, инкубированный при 50°C в течение 28 дней

Вспомогательное вещество	Визуально	Мутность ¹	pH	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации	Годен	0,00	6,0	100	97,1	1,2	51,0	38,3	10,7
Без лиопротектора	Негоден	0,09	6,1	100	70,0	28,5	24,2	35,1	40,7
2% сахарозы	Годен	0,02	6,1	104	90,7	7,4	37,4	39,1	23,6

6% сахарозы	Годен	0,00	6,1	105	96,1	1,8	46,8	39,2	14,1
2% сахар., 2% Gly	Годен	0,02	6,0	114	94,5	3,4	40,9	42,4	16,8
2% сахар., 2% Arg	Годен	0,00	5,9	109	95,9	2,0	47,2	38,4	14,4

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

²Лиофилизированный лекарственный препарат, разведенный до 100 мг/мл REGN727 до анализа.

5 ³Средние значения для исходного материала 4 составов.

Таблица 7: Стабильность лиофилизованного лекарственного препарата, разведенного до 100 мг/мл

Температура хранения	Без хранения	5°C 4 мес.	25°C 3 мес.	40°C 3 мес.	50°C 2 мес.
Мутность ¹	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02
pH	6,2	6,3	6,2	6,2	6,2
% суммарного выделения	100	104	100	98	105
% нативного	96,0	96,5	96,2	95,7	94,9
% агрегата	1,7	1,4	1,7	2,4	2,9
% главная	50,6	51,5	49,2	46,2	43,5
% кислая	38,0	37,9	38,2	39,5	40,1
% основная	11,4	10,5	12,7	14,3	16,2
Биопроба (% этал. станд.) ²	146	НП	НП	НП	152

10 ¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

²Критерии приемлемости: 50-200% от эталонного стандарта

Таблица 8: Совместимость 50 мг/мл mAb-316P после 14 дней при 40°C и влажности 75%

Хранение	Без хранения	Стекло	Поли-пропилен	Поли-стирол	Поли-карбонат	Нержавеющая сталь
Мутность ¹	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
% суммы	100	98	99	104	103	98
% нативного	97,0	96,3	96,3	96,2	96,2	96,1
% агрегата	2,0	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0
% главная	50,8	45,7	44,9	45,2	45,6	45,5
% кислая	38,1	42,8	43,6	43,0	42,5	43,2
% основная	11,2	11,5	11,6	11,9	11,8	11,2

15

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 9: Стабильность 150 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P в течение 12 месяцев при -80°C

Температура хранения	Контроль	-80°C	-30°C	-20°C
Мутность (OD 405 нм)	0,00	0,00	0,01	0,01
% общего выделения mAb-316P	100	104	108	111
% выделения нативного	97,5	97,3	97,2	97,2
% выделения агрегатов	1,7	1,8	1,8	1,9
% выделения главной	56,2	56,5	56,4	56,3
% выделения кислой	26,5	25,7	25,7	25,4
% выделения основной	17,4	17,9	17,9	18,2

Таблица 10: Стабильность 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P в течение 3 месяцев при -80°C

Температура хранения	Контроль	-80°C	-30°C	-20°C
Мутность (OD 405 нм) ¹	0,00	0,01	0,01	0,01
% общего выделения REGN727 (ОФ ВЭЖХ)	100	100	104	101
% выделения нативного REGN727 (ЭХ ВЭЖХ)	96,2	96,5	96,4	96,3
% выделения агрегированного REGN727 (ЭХ ВЭЖХ)	2,7	2,5	2,6	2,7
% выделения главной REGN727 (КОХ ВЭЖХ)	58,5	56,2	56,6	56,7
% выделения кислой REGN727 (КОХ ВЭЖХ)	29,4	29,4	29,4	29,4
% выделения основной REGN727 (КОХ ВЭЖХ)	12,2	14,5	14,0	13,9

- 5 Мутность (OD 405 нм)¹¹ Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 11: Стабильность 150 мг/мл mAb-316P FDS¹ при стрессовом воздействии

Стресс-тест	Без стресса ²	Встряхивание		45°C инкубирование		37°C инкубирование		25°C инкубирование		Замор./оттаив.
Время воздействия	0 мин	60 мин	120 мин	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	8 циклов
Внешний вид	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность ³	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
% суммарного выделения	100	101	102	98	98	99	98	100	99	101
% выделения нативного										
% выделения агрегатов	97,4	97,5	97,2	94,2	92,4	95,7	95,1	96,7	96,2	97,1
% выделения главной										
% выделения кислой	1,6	1,7	2,1	3,4	4,1	2,4	2,6	2,0	2,2	1,7
% выделения основной										
Биопроба (% отн. акт.) ⁴	53,6	53,7	54,7	38,7	29,0	46,3	39,5	51,5	49,1	53,9
	27,2	26,1	25,9	39,5	48,6	31,9	36,9	27,8	28,9	26,5
	19,3	20,2	19,5	21,8	22,5	21,8	23,7	20,7	22,0	19,6
	84	НП	84	НП	85	НП	82	НП	98	81

¹10 мМ гистидин, pH 6.0, 0,2% полисорбат 20, 10% сахарозы, 150 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P

5 ²Значения «без стресса» представляют собой среднее обоих исследований стабильности.

³Мутность определяется как относительное изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом

10 ⁴Процент относительной активности; критерии приемлемости: 50-200% от эталонного стандарта

Таблица 12: Стабильность 175 мг/мл mAb-316P FDS¹ при стрессовом воздействии

Стресс-тест	Без стресса ²	Встряхивание		45°C инкубирование		37°C инкубирование		25°C инкубирование		Замор./оттаив.
Время воздействия	0 мин	60 мин	120 мин	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	14 дн	31 дн	8 циклов
Внешний вид	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	НД	Годеи	Годеи

Таблица 12: Стабильность 175 мг/мл mAb-316P FDS¹ при стрессовом воздействии

Стресс-тест	Без стресса ²	Встряхивание		45°C инкубирование		37°C инкубирование		25°C инкубирование		Замор./оттаив. 8 циклов
	0 мин	60 мин	120 мин	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	14 дн	31 дн	
Мутность ³	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,00	0,01	н.д.	0,00	0,01
pH	6,0	6,0	6,0	6,1	6,1	6,0	6,0	н.д.	6,0	6,0
% суммарного выделения	100	96	98	101	98	100	96	н.д.	99	98
% выделения нативного	96,5	96,3	96,4	94,5	91,7	95,7	94,7	н.д.	96,2	96,1
% выделения агрегатов	2,5	2,5	2,5	3,6	5,2	2,8	3,0	н.д.	2,6	2,3
% выделения главной	59,5	58,3	59,0	47,1	38,4	56,3	46,9	н.д.	58,2	59,3
% выделения кислой	30,1	29,3	29,4	39,5	47,6	32,3	39,8	н.д.	30,9	29,5
% выделения основной	10,3	12,4	11,6	13,4	14,1	11,4	13,4	н.д.	11,0	11,1
Биопроба (% отн. акт.) ⁴	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,00	0,01	н.д.	0,00	0,01

¹10 mM гистидин, pH 6.0, 0,01% полисорбат 20, 5% сахарозы, 50 mM аргинина, 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P

²Значения «без стресса» представляют собой среднее обоих исследований стабильности.

5 ³Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

⁴Процент относительной активности; критерии приемлемости: 50-200% от эталонного стандарта

Таблица 13: Стабильность 150 мг/мл mAb-316P DP в PFS

Хранение	0	5°C 6 мес.	25°C 6 мес.	45°C 28 дней
Внешний вид	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность ¹	0,00	0,00	0,00	0,02
pH	6,1	6,1	6,1	6,1
% суммарного выделения	100	102	102	97
% выделения нативного	96,6	96,1	94,2	92,4
% выделения агрегатов	2,4	2,6	3,2	4,3
% выделения главной	58,4	58,5	45,7	35,8
% выделения кислой	31,8	31,3	42,1	50,9
% выделения основной	9,8	10,2	12,2	13,4

10 ¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 14: Стабильность 175 мг/мл mAb-316P DP в PFS

Хранение	0	5°C 6 мес.	25°C 6 мес.	45°C 28 дней
Внешний вид	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность ¹	0,00	0,00	0,02	0,04
pH	6,1	6,1	6,1	6,1
% суммарного выделения	100	103	101	100
% выделения нативного	96,7	96,3	94,6	91,6
% выделения агрегатов	2,3	2,4	3,0	5,4
% выделения главной	59,1	59,7	47,1	37,7
% выделения кислой	31,2	30,6	40,6	48,2
% выделения основной	9,7	9,7	12,3	14,2

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 15: Совместимость 150 мг/мл mAb-316P¹ после 14 дней при 40°C

Хранение	Без хранения Стекло	Стекло	Поли-карбонат	Поли-пропилен	Поли-стирол	Нержавеющая сталь
Мутность ¹²	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
pH	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0	6,0
% суммарного выделения	100	97	104	99	105	104
% выделения нативного	97,4	95,9	95,8	95,7	95,7	95,5
% суммарного выделения	1,7	2,5	2,6	2,7	2,6	2,7
% Main Recovered	53,3	45,8	45,8	44,7	45,6	45,1
% Acidic Recovered	26,9	33,0	32,9	33,8	33,0	33,5
% Basic Recovered	19,8	21,3	21,6	21,6	21,5	21,4

5 ¹10 мМ гистидин, pH 6,0, 0,2% полисорбат 20, 10% сахароза, 150 мг/мл анти- mAb-

¹Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом

Таблица 16: Совместимость 175 мг/мл mAb-316P¹ после 14 дней при 40°C

Хранение	Без хранения Стекло	Стекло	Поли-карбонат	Поли-пропилен	Поли-стирол	Нержавеющая сталь
Мутность ³	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
pH	6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,1
% суммарного выделения	100	98	104	100	105	98
% выделения нативного	96,6	95,3	95,2	95,1	95,2	94,9

Таблица 16: Совместимость 175 мг/мл mAb-316P¹ после 14 дней при 40°C

Хранение	Без хранения Стекло	Стекло	Поли-карбонат	Поли-пропилен	Поли-стирол	Нержавеющая сталь
% выделения агрегатов	2,4	3,0	3,1	3,2	3,1	3,3
% выделения главной	57,7	51,3	51,0	50,6	51,0	50,4
% выделения кислой	30,0	34,5	34,5	35,0	34,5	35,2
% выделения основной	12,3	14,2	14,5	14,4	14,4	14,4

¹10 mM гистидин, pH 6,0, 0,01% полисорбат 20, 5% сахарозы, 50 mM аргинина и 175 мг/мл mAb

²Мутность = изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

5

Таблица 17: Гетерогенность заряда mAb-316P по данным КИЭФ

	Партия 1		Партия 2		Партия 1:Партия 2 (смесь 1:1)	
№ пика	pI	Площадь пика, %	pI	Площадь пика, %	pI	Площадь пика, %
1	7,99 (0,01)	0,8 (0,1)	7,99 (0,01)	0,8 (0,0)	7,98 (0,01)	0,7 (0,1)
2	8,15 (0,00)	2,6 (0,1)	8,15 (0,01)	2,6 (0,1)	8,14 (0,01)	2,6 (0,1)
3	8,29 (0,00)	6,9 (0,1)	8,29 (0,00)	7,0 (0,0)	8,28 (0,01)	6,9 (0,1)
4	8,42 (0,00)	18,4 (0,2)	8,42 (0,00)	18,6 (0,2)	8,42 (0,01)	18,5 (0,1)
5	8,54 (0,01)	66,4 (0,3)	8,55 (0,01)	68,0 (0,3)	8,54 (0,00)	67,3 (0,1)
6	8,65 (0,00)	4,0 (0,1)	8,65 (0,00)	2,8 (0,1)	8,64 (0,01)	3,4 (0,0)
7	8,82 (0,00)	0,9 (0,1)	8,81 (0,00)	0,3 (0,1)	8,81 (0,01)	0,6 (0,1)

Таблица 18: Гликозилированные пептиды mAb-316P

№ пика	Тяжелая цепь Фрагмент	Полученная масса (Да)		Комментарии
		Партия 1	Партия 2	
15a	294-302	2957,15	2957,19	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₂
	294-302	2795,11	2795,11	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₁
	294-302	2404,94	2404,94	(GlcNAc) ₂ (Man) ₅
	294-302	2592,02	2591,96	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₁ (Gal) ₁
	294-302	2267,94	2267,92	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₂ (GlcNAc) ₁
	294-302	2121,82	2121,80	(GlcNAc) ₂ (Man) ₂ (GlcNAc) ₁

Таблица 18: Гликозилированные пептиды mAb-316P

№ пика	Тяжелая цепь Фрагмент	Полученная масса (Да)		Комментарии
		Партия 1	Партия 2	
15b	294-302	2283,91	2283,91	(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₁
	294-302	2429,98	2429,98	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₁
	294-302	2486,99	2486,97	(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	294-302	2633,05	2633,06	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
16	294-302	1188,52	1188,53	non-glycosylated NST site
17a	290-302	3439,44	3439,44	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₂
	290-302	3278,40	3277,35	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₁
	290-302	2887,20	2887,26	(GlcNAc) ₂ (Man) ₅
17b	290-302	2766,24	2766,21	(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₁
	290-302	2969,34	2969,25	(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	290-302	2912,28	2912,25	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₁
	290-302	3115,32	3115,35	(Fuc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂

Таблица 19: Интегрированные площади пиков гликанов, по данным капиллярного электрофореза

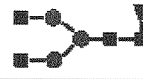
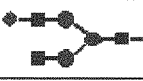
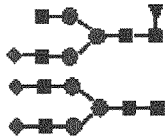
	Площадь пика партии ^a , %	Площадь пика партии 2, %	Площадь пика смесь партий 1:1, %	Идентификация гликана ¹	Структура гликана ²
1	8,6 (0,2)	6,8 (0,1)	7,6 (0,2)	G0-Fuc	
2	1,8 (0,0)	2,9 (0,1)	2,3 (0,1)	Man5	
3	0,7 (0,0)	0,5 (0,0)	0,6 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
4	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
5	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
6	34,4 (0,1)	45,8 (0,2)	40,4 (0,2)	G0	
7	1,5 (0,0)	0,7 (0,0)	1,1 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
8	Ниже ПО	0,9 (0,0)	0,6 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
9	Ниже ПО	0,7 (0,0)	0,6 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
10	29,5 (0,1)	24,7 (0,0)	27,0 (0,1)	G1(1-6)	

Таблица 19: Интегрированные площади пиков гликанов, по данным капиллярного электрофореза

	Площадь пика партии ^a , %	Площадь пика партии 2, %	Площадь пика смесь партий 1:1, %	Идентификация гликана ¹	Структура гликана ²
11	10,1 (0,1)	8,6 (0,0)	9,3 (0,1)	G1(1-3) и/или G2-Fuc	
12	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
13	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
14	11,7 (0,0)	7,1 (0,1)	9,4 (0,2)	G2	

¹ G#-fuc и G# обозначают нефукозилированные и фукозилированные гликаны, соответственно. Символ # означает 0, 1 или 2.

² Обозначение гликана: ▼ фукоза, ■ N-ацетилглюкозамин, • манноза, ♦ галактоза. ПО = Предел определения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Стабилизированные составы, содержащие антитела анти-PCSK9

<130> 7050A

<160> 9

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10
15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25
30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys His Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Asn Trp Gly Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 3

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 4

Ala Lys Asp Ser Asn Trp Gly Asn Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10
15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Arg
20 25

30

Ser Asn Asn Arg Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75
80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90
95

Tyr Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 6

Gln Ser Val Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Arg Asn Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 7

Trp Ala Ser
1

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 8

Gln Gln Tyr Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Pro	15
1 5 10	
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu	30
20 25	
Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu	45
35 40	
Glu Asp Gly Leu Ala Asp Ala Pro Glu His Gly Ala Thr Ala Thr Phe	
50 55 60	
His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val	80
65 70 75	
Val Leu Lys Glu Glu Thr His Arg Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg	95
85 90	
Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu	110
100 105	
His Val Phe His His Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly	125
115 120	
Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu	140
130 135	
Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg	160
145 150 155	
Ile Thr Pro Ala Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Lys Gly	175
165 170	
Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp	190
180 185	
His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu Ser Val	
195 200 205	
Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp	
210 215 220	
Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly	240
225 230 235	
Val Ala Lys Gly Ala Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln	255
245 250	
Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg	270
260 265	
Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro	285
275 280	

Leu	Ala	Gly	Gly	Tyr	Ser	Arg	Val	Phe	Asn	Ala	Ala	Cys	Gln	Arg	Leu		
290								295						300			
Ala	Arg	Ala	Gly	Val	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Asn	Phe	Arg	Asp		
305					310							315				320	
Asp	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Val		
335					325						330						
Gly	Ala	Thr	Asn	Ala	Gln	Asp	Gln	Pro	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Gly		
				340							345				350		
Thr	Asn	Phe	Gly	Arg	Cys	Val	Asp	Leu	Phe	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Ile		
355							360						365				
Ile	Gly	Ala	Ser	Ser	Asp	Cys	Ser	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Arg	Ser	Gly		
370							375						380				
Thr	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	His	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Met	Met	Leu		
385					390						395				400		
Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ile		
				405					410				415				
His	Phe	Ser	Ala	Lys	Asp	Val	Ile	Asn	Glu	Ala	Trp	Phe	Pro	Glu	Asp		
				420					425							430	
Gln	Arg	Val	Leu	Thr	Pro	Asn	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Ser	Thr		
435							440									445	
His	Arg	Ala	Gly	Trp	Gln	Leu	Phe	Cys	Arg	Thr	Val	Trp	Ser	Ala	His		
450					455							460					
Ser	Gly	Pro	Thr	Arg	Met	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Arg	Cys	Ala	Gln	Asp		
465					470					475				480			
Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Cys	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Arg	Arg		
				485					490				495				
Gly	Glu	Arg	Ile	Glu	Ala	Gln	Gly	Gly	Lys	Arg	Val	Cys	Arg	Ala	His		
				500				505				510					
Asn	Ala	Phe	Gly	Gly	Glu	Gly	Val	Tyr	Ala	Ile	Ala	Arg	Cys	Cys	Leu		
515							520						525				
Leu	Pro	Gln	Val	Asn	Cys	Ser	Val	His	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Gly	Ala		
530							535					540					
Ser	Met	Gly	Thr	Arg	Val	His	Cys	His	Gln	Gln	Gly	His	Val	Leu	Thr		
545					550						555						
560																	
Gly	Cys	Ser	Ser	His	Trp	Glu	Val	Glu	Asp	Leu	Gly	Thr	His	Lys	Pro		
				565					570				575				
Pro	Val	Leu	Arg	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Asn	Gln	Cys	Val	Gly	His	Arg		
				580					585				590				
Glu	Ala	Ser	Ile	His	Ala	Ser	Cys	Cys	His	Ala	Pro	Gly	Leu	Glu	Cys		
595							600					605					
Lys	Val	Lys	Glu	His	Gly	Ile	Pro	Ala	Pro	Gln	Glu	Gln	Val	Ile	Val		
610							615					620					

Ala Cys Glu Asp Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Pro Leu Pro Gly
625 630 635
640

Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val
645 650 655

Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Lys Glu Ala Val
660 665 670

Ala Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Val Gln Ala Ser
675 680 685

Gln Glu Leu Gln
690

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий фармацевтический состав, включающий:

- (a) $50 \pm 7,5$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают человеческую пропротеиновую конвертазу субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), где антитело содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO:2, HCDR2 с SEQ ID NO:3, HCDR3 с SEQ ID NO:4, определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO:7 и LCDR3 с SEQ ID NO:8;
- (b) $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ гистидина ($\text{pH } 6,0 \pm 0,3$);
- (c) $0,01\% \text{ вес/об} \pm 0,0015\% \text{ вес/об}$ полисорбата 20; и
- (d) $10\% \pm 1,5\% \text{ вес/об}$ сахарозы.

2. Жидкий фармацевтический состав по п. 1 или 2, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVD), содержащий SEQ ID NO:1, и переменный домен легкой цепи (LCVD), содержащий SEQ ID NO:5.

3. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором: более 90% антител имеет молекулярный вес $155 \text{ кДа} \pm 1 \text{ кДа}$; более 50% антител имеет изоэлектрическую точку около 8,5; и от 75% до 90% антител фукозилированы.

4. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 91% антитела имеет нативную конформацию через 28 дней при 45°C .

5. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 35% антитела остается в главной заряженной форме через 28 дней при 45°C .

6. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 94% антитела имеют нативную конформацию через 6 месяцев при 25°C .

7. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 45% антитела остается в главной заряженной форме через 6 месяцев при 25°C .

8. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 96% антитела имеет нативную конформацию через 6 месяцев при 5°C.
9. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 58% антитела остается в главной заряженной форме через 6 месяцев при 5°C.
- 5 10. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 96% антитела остается в главной заряженной форме через три месяца при -20°C, -30°C или -80°C.
11. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, в котором по меньшей мере 56% антитела остаются в главной заряженной форме через три месяца при -20°C,
10 -30°C или -80°C.
12. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, где состав содержит около 175 мг/мл антитела.
13. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, где состав содержит около 150 мг/мл антитела.
- 15 14. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, где состав содержит около 100 мг/мл антитела.
15. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, где состав содержит около 75 мг/мл антитела.
16. Жидкий фармацевтический состав по п. 1, где состав содержит около 50
20 мг/мл антитела.

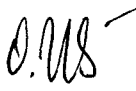
По доверенности

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201791185

Дата подачи: 27 июля 2012 (27.07.2012)		Дата испрашиваемого приоритета: 28 июля 2011 (28.07.2011)	
Название изобретения: Стабилизированные составы, содержащие антитела анти-рск9			
Заявитель: РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.			
☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) ☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)	
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) A61K 39/395, C07K 16/40			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
A	US 2010/0166768 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 01.07.2010, реферат, фиг. 1, SEQ ID NO:92, параграф [0043]		1-16
A	WO 2011/053759 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP. et al.) 05.05.2011, с. 49, 51, 52		1-16
A	WO 2004/055164 A2 (ABGENIX, INC. et al.) 01.07.2004, параграфы [0018], [0019], [0049], [0055], [0085], [0087], [0092]		1-16
☐ последующие документы указаны в продолжении графы В			
* Особые категории ссылочных документов:		☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении	
"А" документ, определяющий общий уровень техники		"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения	
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности	
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории	
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"&" документ, являющийся патентом-аналогом	
"D" документ, приведенный в евразийской заявке		"L" документ, приведенный в других целях	
Дата действительного завершения патентного поиска:		18 сентября 2017 (18.09.2017)	
Наименование и адрес Международного поискового органа:		Уполномоченное лицо :	
Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		 О. Н. Шанова Телефон № (499) 240-25-91	