

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
05 июля 2018 (05.07.2018)



(10) Номер международной публикации
WO 2018/124948 A1

(51) Международная патентная классификация:
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2017/050133

(22) Дата международной подачи:
29 декабря 2017 (29.12.2017)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2016152691 30 декабря 2016 (30.12.2016) RU
2017146821 29 декабря 2017 (29.12.2017) RU

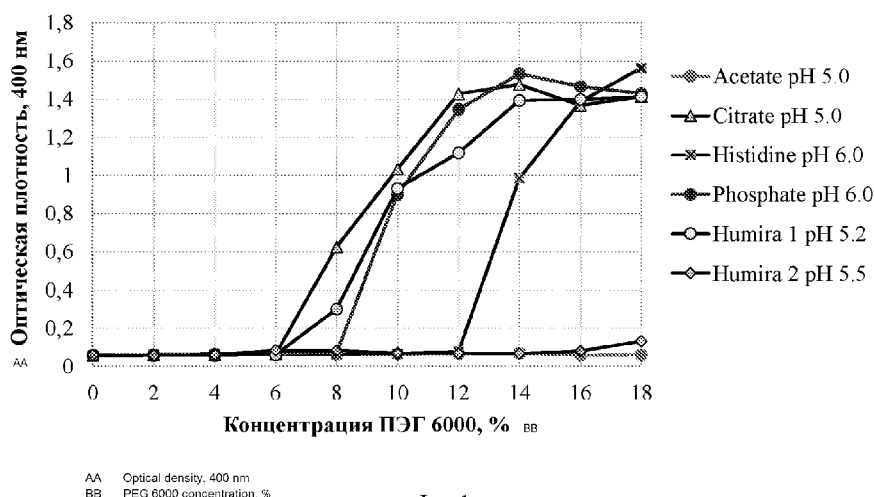
(71) Заявитель: ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИОКАД" (JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD") [RU/RU]; ул. Связи, д. 34, лит. А, п. Стрельна, Петродворцовый район, Санкт-Петербург, 198515, St. Petersburg (RU).

(72) Изобретатели: ЛОМКОВА, Екатерина Александровна (LOMKOVA, Ekaterina Aleksandrovna); пр-кт Московский, 216, кв. 19 Санкт-Петербург, 196066, St. Petersburg (RU). ЯКОВЛЕВ, Александр Олегович (IAKOVLEV, Aleksandr Olegovich); ул. Донецкая, д. 26, кв. 9, Москва, 109651, Moscow (RU). ШИТИКОВА, Виктория Олеговна (SHITIKOVA, Viktoriya Olegovna); ул. 2-я Красина, 74, кв. 198, Тверь, Тверская обл., 170021, Tver, Tverskaya obl. (RU). РЯХОВСКАЯ, Анастасия Михайловна (RYAKHOVSKAYA, Anastasiya Mikhajlovna); ул. Заводская, д. 6, кв. 6, г. Кашин, Кашинский р-н, Тверская обл., 171640, g. Kashin, Kashinskij r-n, Tverskaya obl. (RU).

(74) Агент: ДАНИЛОВА, Галина Владимировна (DANILOVA, Galina Vladimirovna); ЗАО "БИОКАД", Литер А, д. 34, ул. Связи, п. Стрельна, Петродворцовый район, Санкт-Петербург, 198515, St. Petersburg (RU).

(54) Title: AQUEOUS PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF A RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODY TO FNO α

(54) Название изобретения: ВОДНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ФНО α



Фиг. 1.

(57) Abstract: The invention relates to improved aqueous pharmaceutical compositions of a recombinant monoclonal antibody to FNO α , and to a method for producing same. The present invention also relates to the use of improved aqueous pharmaceutical compositions of a recombinant monoclonal antibody to FNO α to treat FNO α -mediated diseases. The proposed invention allows prevention of physical-chemical instability expressed in the formation of aggregates and fragments of proteins or in the modification of proteins in a solution, and also prevents instability during freezing/thawing, agitating and shaking.

(57) Реферат: Изобретение относится к улучшенным водным фармацевтическим композициям рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α и способу его получения. Настоящее изобретение также относится к применению улучшенных водных фармацевтических композиций рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α . Предложенное изобретение позволяет предотвращать физико-химическую нестабильность, выраженную в образовании агрегатов и фрагментов белков или модификацию белков в растворе, а также предотвращает нестабильность при замораживании-размораживании, перемешивании и встряхивании.

[продолжение на следующей странице]



WO 2018/124948 A1

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

- касающаяся установления личности изобретателя (правило 4.17 (i))
- касающаяся права заявителя подавать заявку на патент и получать его (правило 4.17 (ii))
- касающаяся права испрашивать приоритет предшествующей заявки (правило 4.17 (iii))
- об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- в черно-белом варианте; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

**Водная фармацевтическая композиция рекомбинантного
моноклонального антитела к ФНО α**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к медицинской фармакологии и касается, в частности, водной фармацевтической композиции антител человека, которые специфически связывают или нейтрализуют ФНО α , и ее применению.

Уровень техники

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО α) представляет собой природный цитокин млекопитающих, продуцируемый различными типами клеток, включая моноциты и макрофаги, в ответ на эндотоксин или другие стимулы. ФНО α представляет собой основной медиатор воспалительных, иммунологических и патофизиологических реакций (Grell, M., et al. (1995) Cell, 83: 793-802).

Растворимый ФНО α образуется посредством расщепления трансмембранного белка-предшественника (Kriegler, et al. (1988) Cell 53: 45-53), и секретируемые полипептиды массой 17 килодальтон (кДа) собираются в растворимые гомотримерные комплексы (Smith, et al. (1987), J. Biol. Chem. 262: 6951-6954; Butler, et al. (1986), Nature 320:584; Old (1986), Science 230: 630). Затем эти комплексы связываются с рецепторами, находящимися на множестве клеток. Связывание обеспечивает ряд провоспалительных эффектов, включая (i) высвобождение других провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин (IL)-6, IL-8 и IL-1, (ii) высвобождение матриксных металлопротеиназ и (iii) усиление экспрессии эндотелиальных молекул адгезии, дополнительно усиливая воспалительные и иммунный каскады, привлекая лейкоциты во внесосудистые ткани.

Существует множество нарушений, ассоциированных с повышенными уровнями ФНО α . Например, показано, что экспрессия ФНО α повышается при ряде заболеваний человека, включая такие хронические заболевания, как ревматоидный артрит (RA), воспалительные нарушения кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, сепсис, застойную сердечную недостаточность, бронхиальную астму и рассеянный склероз. ФНО α также обозначают как провоспалительный цитокин.

Физиологически ФНО α также ассоциирован с защитой от конкретных инфекций (Cerami. et al. (1988), Immunol. Today 9:28). ФНО α высвобождают макрофаги, активированные липополисахаридами грамотрицательных бактерий. По существу, ФНО α , по-видимому, является очень важным эндогенным медиатором,

вовлеченным в развитие и патогенез эндотоксического шока, ассоциированного с бактериальным сепсисом.

Адалимумаб (Хумира (Humira®), AbbVie, Inc.) представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело IgG1 человека, специфичное к ФНО человека. Это антитело также известно как D2E7. Адалимумаб состоит из 1330 аминокислот, описан и запатентован в патенте США № 6090382 (международная заявка WO9729131), описание адалимумаба, таким образом, включено в качестве ссылки полностью. Как правило, адалимумаб получают посредством технологии рекомбинантных ДНК в экспрессирующей системе с клетками млекопитающего, такими как, например, клетки китайского хомяка. Адалимумаб специфически связывается с ФНО и нейтрализует биологические функции ФНО, блокируя его взаимодействие с рецепторами ФНО p55 и p75 на клеточной поверхности.

В данной области известны различные составы адалимумаба (См., например, международные заявки WO2004016286 и WO2012065072).

В WO2004016286 описана жидкая композиция для стабилизации антител, применяемых для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающая антитело, например, адалимумаб, буферную систему, полисорбат и средства для поддержания изотоничности раствора, например, маннитол и хлорид натрия. В композиции используется цитрат-фосфатный буфер (состав Хумира 1). Вышеуказанный состав имеет ряд недостатков: 1) недостаточная коллоидная стабильность антитела в высоких концентрациях, 2) недостаточная стабильность в условиях теплового стресса, а также 3) агрегация при длительном хранении.

В WO2012065072 описана жидкая композиция для стабилизации антител, применяемых для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающая антитело, например, адалимумаб, а также маннитол, полисорбат 80 (состав Хумира 2). Вышеуказанный состав имеет ряд недостатков: 1) выраженная нестабильность при замораживании и размораживании и 2) низкая температура агрегации.

Таким образом, существует потребность в создании нового лекарственного препарата, содержащего антитело, который связывает ФНО α , например, адалимумаб.

Изобретение относится к стабильным водным композициям, содержащим адалимумаб, которые обеспечивают его длительное хранение, а также легко переносят заморозку-разморозку и термический стресс.

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к водной фармацевтической композиции для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения, содержащей рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α , буферный агент (или буферную

систему) на основе ацетат-ионов, трегалозу или пролин или их комбинацию или трегалозу и аргинин, полисорбат 20, полисорбат 80 или полоксамер 188 или их комбинацию.

В некоторых вариантах композиции рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.

В некоторых вариантах композиции концентрация моноклонального антитела составляет от 50 до 200 мг/мл.

В некоторых вариантах композиции концентрация ацетатного буферного раствора составляет от 1 до 100 мМ.

В некоторых вариантах композиции имеет рН от 4 до 7.

В некоторых вариантах композиции концентрация трегалозы составляет от 25 до 150 мг/мл.

В некоторых вариантах композиции концентрация пролина составляет от 5 до 40 мг/мл.

В некоторых вариантах композиции концентрация аргинина составляет от 0.05 до 1.0 мг/мл.

В некоторых вариантах композиции концентрация полисорбата 20 составляет от 0.05 мг/мл до 10 мг/мл.

В некоторых вариантах композиции концентрация полисорбата 80 составляет от 0.05 мг/мл до 10 мг/мл.

В некоторых вариантах композиции концентрация полоксамера 188 составляет от 0.05 мг/мл до 10 мг/мл.

В некоторых вариантах композиции содержит от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 1.0 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до рН 5.0 – 6.0, от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиции рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.

В некоторых вариантах композиции содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до рН 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиции содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до рН 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиции содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до рН 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиции содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до рН 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 1.0 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиции рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 1.0 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.0 – 6.0, от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиции рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл

трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полуксамера 188.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающий введения вышеуказанных композиций в эффективном количестве.

В некоторых вариантах способа лечения, заболевание, опосредованное ФНО α , выбирают из активного ревматоидного артрита (среднетяжелой и тяжелой степени), активного псориатического артрита, активного анкилозирующего спондилита, хронического бляшечного псориаза (среднетяжелой или тяжелой степени), язвенного колита (среднетяжелой и тяжелой степени), аксиального спондилоартрита, активного гнойного гидраденита, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона (среднетяжелой или тяжелой степени), увеита, активного энтезит-ассоциированного артрита.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанных композиций для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α .

В некоторых вариантах применения заболевание выбирают из активного ревматоидного артрита (среднетяжелой и тяжелой степени), активного псориатического артрита, активного анкилозирующего спондилита, хронического бляшечного псориаза (среднетяжелой или тяжелой степени), язвенного колита (среднетяжелой и тяжелой степени), аксиального спондилоартрита, активного гнойного гидраденита, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона (среднетяжелой или тяжелой степени), увеита, активного энтезит-ассоциированного артрита.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения вышеуказанных композиций, который включает добавление в водную фазу ацетатных буферных агентов, с последующим добавлением, в любой последовательности, следующих компонентов: осмолитика и/или стабилизатора, выбранного из группы: трегалозы, пролина или их сочетания, рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , поверхностно-активного вещества, выбранного из группы: полисорбата 20, полисорбата 80, полуксамера 188 или их сочетания.

Краткое описание чертежей

Фиг.1. Зависимость оптической плотности растворов при 400 нм от концентрации ПЭГ 6000 после приготовления.

Фиг.2. Зависимость оптической плотности растворов при 400 нм от концентрации ПЭГ 6000 после приготовления.

Фиг.3. Зависимость оптической плотности растворов при 400 нм от концентрации ПЭГ 6000 после приготовления.

Фиг.4. Точка агрегации адалимумаба в ацетатном буферном растворе, pH 5.0.

T_{ag} 74.0°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, кcps.

Фиг.5. Точка агрегации адалимумаба в цитратном буферном растворе, pH 5.0.

T_{ag} 69.5°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, кcps.

Фиг.6. Точка агрегации адалимумаба в гистидиновом буферном растворе, pH 6.0.

T_{ag} 69.5°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, кcps.

Фиг.7. Точка агрегации адалимумаба в фосфатном буферном растворе, pH 6.0.

T_{ag} 71.0°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, кcps.

Фиг.8. Точка агрегации адалимумаба в составе Хумира 1, pH 5.2. T_{ag} 69.5°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, кcps.

Описание изобретения

Определения и общие методы

Термины, используемые в настоящем описании, как правило, имеют их обычные для данной области значения в пределах контекста изобретения и в конкретном контексте, где используют каждый термин. Ниже, или в другом месте описания, определены некоторые термины, которые используют для описания изобретения, для предоставления практику дополнительного руководства в отношении описания изобретения. Приведены синонимы некоторых терминов. Изложение одного или нескольких синонимов не исключает использование других синонимов. Использование примеров в любом месте настоящего описания, включая примеры любых терминов, описываемых в настоящем документе, является исключительно иллюстративным и никоим образом не ограничивает объем и значение изобретения или любого иллюстрируемого объекта. Изобретение не ограничено различными вариантами осуществления, приведенными в настоящем описании.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области, к которой принадлежит изобретение. В случае конфликта руководствоваться следует настоящим документом, включая определения.

Термин «адалимумаб» является синонимом активному фармацевтическому ингредиенту в Хумире®, а также белком, рассматриваемым или подразумеваемым его биоаналогичными или биоулучшенными вариантами. Адалимумаб представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело IgG1 человека, специфичное к ФНО человека. Адалимумаб также известен как D2E7.

Адалимумаб содержит две легкие цепи с молекулярной массой приблизительно 24 кДа каждая и две IgG1 тяжелые цепи с молекулярной массой приблизительно 49 кДа каждая. Каждая легкая цепь состоит из 214 аминокислотных остатков, а каждая тяжелая цепь состоит из 451 аминокислотного остатка. Таким образом, адалимумаб состоит из 1330 аминокислот. Термин адалимумаб также предназначен для включения так называемых биоаналогичных или биоулучшенных вариантов белка адалимумаба, используемых в коммерчески доступной Хумире®. Например, вариант коммерческой Хумиры® может быть приемлем для FDA, когда он оказывает по существу такое же фармакологическое действие, как коммерчески доступная Хумира®, даже если он может демонстрировать определенные физические характеристики, такие как профиль гликозилирования и кислотно-щелочной профиль, которые могут быть, если не идентичными Хумире®, то сходными с ними.

Для целей настоящей заявки термин «адалимумаб» также включает адалимумаб с незначительными модификациями в структуре аминокислот (включая делеции, введения и/или замены аминокислот) или в свойствах гликозилирования и кислотно-щелочного профиля, которые значимо не влияют на функцию полипептида. Термин "адалимумаб" включает все формы и составы Хумиры®, включая в качестве неограничивающих примеров концентрированные составы, инъектируемые готовые к применению составы; составы, восстанавливаемые водой, спиртом и/или другими ингредиентами, и другие.

Термин «ФНО α человека», который также известен как hTNF α или hTNF, или TNF α , предназначен для обозначения цитокина человека, который существует в виде секретируемой формы массой 17 кДа и мембраноассоциированной формы массой 26 кДа, биологически активная форма которого состоит из тримера нековалентно связанных молекул массой 17 кДа. Структура ФНО α дополнительно описана, например, в Pennica, D., et al. (1984) Nature 312:724- 729; Davis, J. M., et al. (1987) Biochemistry 26:1322-1326 и Jones, E. Y., et al. (1989) Nature 338:225-228. Термин rhTNF α человека предназначен для включения рекомбинантного ФНО α человека, который можно получать стандартными способами рекомбинантной экспрессии или приобретать коммерчески (R&D Systems, каталожный № 210-TA, Minneapolis, Minn.).

Как используют в настоящем документе, термин "антитело" относится к молекулам типа иммуноглобулин, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой внутренними дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращаемой в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой

цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращаемой в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно дополнительно разделять на области гипервариабельности, обозначаемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередуемые областями, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенными от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В одном из вариантов осуществления изобретения состав содержит антитело с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, подобными тем, что описаны в патентах США № 6090382; 6258562 и 8216583.

Антитело или его антигенсвязывающая часть могут являться частью более крупной молекулы иммуноадгезии, формируемой ковалентными или нековалентными ассоциациями антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование области сердцевины стрептавидина с получением тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки с получением бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Из целых антител общепринятыми способами, такими как расщепление папаином или пепсином, можно получать части антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂ целых антител, соответственно. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии можно получать стандартными технологиями рекомбинантных ДНК, как описано в настоящем документе.

Как используют в настоящем документе, термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител с другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с ФНО α , по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от ФНО α). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с ФНО α , может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы ФНО α других видов. Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать других клеточных материалов и/или химических веществ.

Термин «антитело к ФНО α » относится к антителу человека против ФНО α , описанному в настоящем описании, а также описанному в патентах США № 6090382; 6258562; 6509015; 7223394 и 6509015. Термин антитело к ФНО α , используемый в изобретении, представляет

собой антитело против ФНО α или его фрагмент, включая инфликсимаб (ремикейд®, Johnson and Johnson; описанный в патенте США № 5656272); CDP571 (гуманизированное моноклональное антитело IgG4 против ФНО-альфа); CDP870 (фрагмент гуманизированного моноклонального антитела против ФНО-альфа); dAb против ФНО (Peptech); CNT0148 (голимумаб; Centocor, см. WO 02/12502 и U.S. 7521206 и U.S. 7250165); и адалимумаб (HUMIRA® Abbott Laboratories, mAb человека против ФНО, описанное в US 6090382 в качестве D2E7). Дополнительные антитела к ФНО, которые можно использовать в изобретении, описаны в патентах США № 6593458; 6498237; 6451983 и 6448380. В другом варианте осуществления ингибитор ФНО α представляет собой слитый белок ФНО, например, этанерцепт (энбрель®, Amgen; описанный в WO 91/03553 и WO 09/406476). В другом варианте осуществления, ингибитор ФНО α представляет собой рекомбинантный связывающий ФНО белок (r-TBP-I) (Serono).

Термин «длительное хранение» или «долговременная стабильность» следует понимать, как обозначение того, что фармацевтическая композиция может храниться в течение трех месяцев или более, в течение шести месяцев или более и предпочтительно в течение одного года или более, наиболее предпочтительно, с минимальным сроком хранения в стабильном состоянии по меньшей мере два года. В общем, термины «длительное хранение» и «долговременная стабильность» дополнительно включают продолжительности хранения в стабильном состоянии, которые по меньшей мере сравнимы или лучше, чем срок хранения в стабильном состоянии, как правило, необходимый для доступных в настоящее время коммерческих составов адалимумаба без потерь в стабильности, которые могут сделать состав непригодным для определенного для него фармацевтического применения. Длительное хранение также следует понимать, как обозначение того, что фармацевтическую композицию хранят или в виде жидкости при 2–8°C, или замораживают, например, при –18°C или менее. Также предусмотрено, что композицию можно замораживать и размораживать не менее одного раза.

Термин «стабильное состояние» в отношении длительного хранения следует понимать, как означающий, что адалимумаб, содержащийся в фармацевтических композициях, теряет не более 20%, или более предпочтительно 15%, или даже более предпочтительно 10%, а наиболее предпочтительно 5% своей активности относительно активности композиции в начале хранения.

Термин «эксципиент» или «вспомогательное вещество» используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению.

Термин «сахар» относится к моносахаридам, дисахаридам и полисахаридам или их смесям. Примеры сахаров в качестве

неограничивающих примеров включают сахарозу, трегалозу, глюкозу, декстрозу и другие.

Термин «полиол» в том виде, как он здесь использован, относится к эксципиенту с множеством гидроксильных групп и включает сахарные спирты и сахарные кислоты. Примеры полиолов в качестве неограничивающих примеров включают маннит (маннитол), сорбит (сорбитол), и другие.

Термин «буфер», «буферная композиция», «буферный агент» в том виде, как он здесь использован, относится к добавляемой композиции, которая дает возможность жидкому препарату антитела проявлять устойчивость к изменениям pH, обычно посредством действия компонентов его кислотно-основного конъюгата. Когда делается ссылка на концентрацию буфера, подразумевается то, что указанная концентрация представляет собой суммарную молярную концентрацию свободной кислотной и свободной основной формы данного буфера. Примеры буферов, которые известны специалистам и могут быть найдены в литературе, включают, но не ограничиваются ими, гистидиновые, цитратные, сукцинатные, ацетатные, фосфатные, фосфатно-солевой, цитратно-фосфатный буферы, а также буферы на основе трометамина и тому подобное или их подходящие смеси.

Термины «агент, регулирующий тоничность» или «агент, контролирующий тоничность», а также «осмолитик» или «осмотический агент» в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата антитела. В определенных воплощениях агент, регулирующий тоничность, может подводить осмотическое давление жидкого препарата антитела до изотоничного так, что данный препарат антитела является физиологически совместимым с клетками ткани организма субъекта. В еще одном воплощении «агент, регулирующий тоничность», может способствовать улучшению стабильности описанных здесь антител. «Изотоничный» препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм. Термин «гипотонический» описывает препарат с осмотическим давлением, меньшим, чем осмотическое давление человеческой крови. Соответственно, термин «гипертонический» используется для описания препарата с осмотическим давлением, превышающим осмотическое давление человеческой крови. Изотоничность можно измерять с использованием, например, парового или криоскопического осмометра. Агент, регулирующий тоничность, может находиться в энантиомерной (например, L- или D-энантиомер) или рацемической форме; в форме изомеров, таких как альфа или бета, включая альфа, альфа; или бета, бета; или альфа, бета; или бета, альфа; в форме свободной кислоты или

свободного основания; в форме соли; в гидратированной форме (например, моногидрат) или в безводной форме.

Термин «поверхностно-активное вещество» (другое название сурфактант или детергент, или ПАВ) в том виде, как он здесь использован, относится к эксципиенту, который может изменять поверхностное натяжение жидкого препарата антитела. В определенных воплощениях данное поверхностно-активное вещество снижает поверхностное натяжение жидкого препарата антитела. В других воплощениях «поверхностно-активное вещество» может способствовать улучшению коллоидной стабильности или растворимости любого антитела в данном препарате. Поверхностно-активное вещество может снижать агрегацию приготовленного препарата антитела, и/или минимизировать образование частиц в данном препарате, и/или уменьшать адсорбцию. Поверхностно-активное вещество также может улучшать стабильность антитела во время, в том числе после замораживания/оттаивания и при встряхивании. Поверхностно-активные вещества могут быть ионными или неионными. Иллюстративные неионные поверхностно-активные вещества, которые можно включать в составы по настоящему изобретению, включают, например, алкилполи(этиленоксид), алкилполиглюкозиды (например, октилглюкозид и децилмальтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид-МЕА, кокамид-DEA и кокамид-TEA. Конкретные неионные поверхностно-активные вещества, которые можно включать в составы по настоящему изобретению, включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80 (Tween 80), полисорбат 81 и полисорбат 85; полуксамеры, такие как полуксамер 188 (Kolliphor P188), полуксамер 407; полиэтиленполипропиленгликоль или полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этилен- и пропиленгликоля (например, плюроники PF68 и т.д.).

Термин «лиофилизированный», используемый в настоящем документе, относится к препарату, который был подвергнут процессу, известному в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающему в себя замораживание препарата и последующее удаление льда из замороженного содержимого.

Термин «аминокислота», используемый в настоящем документе, означает аминокислоту (свободную аминокислоту, т.е. не аминокислоту в пептиде или в белковой последовательности). Аминокислоты, используемые в настоящем изобретении, включают в себя, но не ограничиваются ими, например, аргинин, глицин, лизин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, триптофан, серин, цистеин, метионин и пролин.

«Фармацевтическая композиция» обозначает композицию, включающую в себя антитело согласно изобретению и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых наполнителей, растворителей, разбавителей, носителей, вспомогательных, распределяющих, средств доставки, таких как консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Примерами суспендирующих агентов являются этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтилен, сорбитол и сорбитовый эфир, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси этих веществ. Защита от действия микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, таких как парабены, хлорбутанол, сорбиновая кислота и подобные им соединения. Композиция может включать также изотонические агенты, например, сахара, хлористый натрий и им подобные. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного начала, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, растительные масла (такие, как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры (такие, как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция, фосфат кальция и им подобные. Фармацевтическая композиция для перорального, сублингвального, трансдермального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, местного или ректального введения активного начала, одного или в комбинации с другим активным началом, может быть введена животным и людям в стандартной форме введения в виде смеси с традиционными фармацевтическими носителями. Пригодные стандартные формы введения включают парентеральные формы, имплантаты и трансдермальные системы.

«Лекарственное средство (препарат)» – вещество (или смесь веществ в виде фармацевтической композиции) в виде таблеток, капсул, порошков, лиофилизатов, инъекций, инфузий, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции, косметологии и прочего.

«Лечить», «лечение» и «терапия» относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Используемый в данном документе, чтобы «облегчить» болезнь, заболевание или

состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на «лечение» включают ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Термин "нарушение" означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению. В определение данного термина входят хронические и острые нарушения или заболевания, включающие в себя патологические состояния, которые вызывают предрасположенность млекопитающего к возникновению данного нарушения. Неограничивающие примеры подлежащих лечению заболеваний включают в себя доброкачественные и злокачественные опухоли; лейкозы и лимфоидные злокачественные новообразования, в частности, рак молочной железы, яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, ободочной кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы, предстательной железы или мочевого пузыря; нейронные, глиальные, астроцитарные, гипоталамусные и другие glandулярные, макрофаговые, эпителиальные, стромальные и бластоцельные нарушения; воспалительные, ангиогенные и иммунологические нарушения. Предпочтительным подлежащим лечению нарушением согласно изобретению являются аутоиммунные заболевания.

Термины «иммунный ответ», «аутоиммунная реакция», «аутоиммунное воспаление» относятся, например, к действию лимфоцитов, антиген-представляющих клеток, фагоцитирующих клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, вырабатываемых указанными клетками или клетками печени (включая антитела, цитокины и комплемент, образующиеся в результате селективного повреждения, разрушения или элиминации из человеческого организма инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей).

Термин «аутоиммунное заболевание» в контексте настоящего описания обозначает не злокачественное заболевание или нарушение, возникающее и направленное против собственных (ауто) антигенов и/или тканей индивидуума.

Это определение охватывает, но без ограничения, ревматоидный артрит, артроз, ювенильный хронический артрит, септический артрит, артроз Лайма, псориатический артрит, реактивный артрит, спондилоартропатия, системную красную волчанку, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительные

заболевания кишечника, сахарный диабет, тиреоидит, астму, аллергические заболевания, псориаз, атопический дерматит, склеродермия, реакцию «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, острые или хронические иммунные заболевания, связанные с трансплантацией, саркоидоз, болезнь Кавасаки, болезнь Грейвса, нефротический синдром, синдром хронической усталости, гранулематоз Вегенера, пурпура Геноха-Шенлейна, микроскопический почечный васкулит, хронический активный гепатит, *juvenita*, септический шок, синдром токсического шока, септический синдром, кахексию, синдром приобретенного иммунодефицита, острый поперечный миелит, хорею Гентингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, первичный билиарный цирроз, гемолитическую анемию, взрослых (острый) респираторный дистресс-синдром, алопецию, очаговую алопецию, серонегативную артропатию, артропатии, болезнь Рейтера, псориатическую артропатию, связанную с язвенным колитом артропатию, атопические аллергии, аутоиммунные Буллезные заболевания, пузырчатку *vulgaris*, листовидную пузырчатку, болезнь пемфигоида, линейные IgA, аутоиммунную гемолитическую анемию, Кумбс позитивную гемолитическую анемию, злокачественную анемию, ювенильную злокачественную анемию, артрит, первичный склерозирующий гепатит А, криптогенный аутоиммунный гепатит, фиброзирующие заболевания легких, криптогенный фиброзный альвеолит, поствоспалительные интерстициальные заболевания легких, интерстициальный пневмонит, хроническую эозинофильную пневмонию *chronic*, постинфекционные интерстициальные заболевания легких, подагрический артрит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный гепатит I типа (классический аутоиммунный гепатит или липоид), аутоиммунный гепатит II типа, остеоартрит, первичный склерозирующий холангит, псориаз I типа, псориаз II типа, идеопатическую лейкопению, аутоиммунную нейтропению, ренальные NOS заболевания [renal NOS-disease], гломерулонефрит, микроскопический ренальный васкулит, дискоидный волчаночный эритематоз, идеопатическую или мужскую NOS фертильность, [autoimmunity to sperm], все подтипы множественного склероза, симпатическую офтальмию, вторичную легочную гипертензию при заболеваниях соединительной ткани, синдром Гудпасчура, легочную манифестацию узлового полиартрита, острая ревматическую лихорадку, ревматоидный спондилит, анкилозирующий спондилит, болезнь Стилла, системный склероз, синдром Шенгрена, синдром Такаясу, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопению, аутоиммунный тиреоидит, гипертириозидизм, болезнь Хошимото, аутоиммунный атрофический гипотирозидизм, первичную мексидему, факогенный увеит, первичный васкулит, витилиго, острые заболевания печени, хронические заболевания печени, аллергии, астму, психические заболевания (включая депрессию и

шизофрению), заболевания, опосредованные Th2 типом и Th1 типом, конъюнктивиты, аллергические контактные дерматиты, аллергические риниты, дефицит альфа-1-антитрипсина, амиотрофический латеральный склероз, анемию, цистический фиброз, заболевания, ассоциированные с цитокиновой терапией, демиелизирующие заболевания, дерматиты, иридоциклит/увеит/оптический неврит, повреждение ишемической реперфузии, ишемический инсульт, ювенильный ревматоидный артрит, аутоиммунную энтеропатию, аутоиммунную потерю слуха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунную преждевременную недостаточность яичника и блефарит. Антитело может также лечить любую комбинацию из перечисленных выше расстройств.

Как используют здесь, термин «нарушение, при котором активность ФНО α является вредной», предусматривает включение заболеваний и других нарушений, при которых присутствие ФНО α у субъекта, страдающего от нарушения, как было показано или предполагается, либо обуславливает патофизиологию нарушения, либо является фактором, который усугубляет нарушение. Соответственно нарушение, при котором активность ФНО α является вредной, представляет собой нарушение, при котором ингибирование активности ФНО α , как ожидается, снижает симптомы и/или развитие нарушения. Такие нарушения могут быть обнаружены, например, по повышению концентрации ФНО α в биологической жидкости субъекта, страдающего от нарушения (например, повышение концентрации ФНО α в сыворотке, плазме, синовиальной жидкости и т.п. субъекта), которая может быть определена, например, с помощью антитела против ФНО α , как описано выше. Существует множество примеров нарушений, при которых активность ФНО α является вредной. Применение антител и фрагментов антител, соответствующих нарушению, при лечении специфических нарушений далее обсуждается ниже:

А. Сепсис

Фактор некроза опухоли играет установленную роль в патофизиологии сепсиса с биологическими эффектами, включающими гипотензию, ослабление миокарда, синдром подтекания сосудов, некроз органов, стимуляцию выхода токсических вторичных медиаторов и активацию каскада свертывания крови (см., например, Moeller A., et al.(1990), Cytokine 2:162-169; Патент США No 5231024 Moeller et al.; европейский патент No 260610 B1 Moeller A.; Tracey K.J. and Cerami A. (1994) Annu. Rev. Med. 45:491-503; Russel D. and Thompson R.C. (1993) Curr. Opin. Biotech. 4:714-721). Соответственно человеческие антитела и фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут быть использованы для лечения сепсиса в любом из его клинических проявлений, включая септический шок, эндотоксический шок, сепсис, вызываемый грамотрицательными бактериями, и токсический шоковый синдром.

Более того, для лечения сепсиса антитела против ФНО α и фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут быть введены вместе с одним или более терапевтическим агентом, который может еще более ослабить сепсис, таким как ингибитор интерлейкина-1 (описанные в публикациях PCT No WO 92/16221 и WO 92/17583), цитокин интерлейкин-6 (см., например, публикацию PCT No WO 93/11793) или антагонист фактора активации тромбоцитов (см., например, европейскую патентную заявку No EP 374510). Другие способы комбинированной терапии для лечения сепсиса обсуждаются ниже в подразделе III.

Кроме того, в предпочтительном варианте осуществления антитело против ФНО α и фрагменты антитела, соответствующие изобретению, вводят человеку из подгруппы пациентов с сепсисом, имеющих концентрацию IL-6 в сыворотке или плазме более 500 пг/мл и более предпочтительно 1000 пг/мл во время лечения (см. публикацию PCT No WO 95/20978 Daum L et al.).

В. Аутоиммунные заболевания

Фактор некроза опухоли, как было установлено, играет роль в патофизиологии ряда аутоиммунных заболеваний. Например, ФНО α участвовал в активации воспаления тканей и вызывал разрушение суставов при ревматоидном артрите (см., например, Moeller A. et al. (1990), Cytokine 2:162-169; патент США No 5231024 Moeller et al.; европейский патент No 260610 B1 Moeller A.; Tracey K.J. and Cerami A., supra; end W.P. and Dayer J.M. (1995) ath. Rheum. 38:151-160; Fava R.A. et al. (1993) Clin. Exp. Immunol. 94:261-266). ФНО α участвовал также в стимуляции гибели островков клеток и в образовании инсулин-резистентности при диабете (см., например, Tracey and Cerami, supra; публикация PCT No WO 94/08609). ФНО α участвовал также в появлении цитотоксичности в отношении олигодендроцитов и индукции воспалительных бляшек при рассеянном склерозе (см., например, Tracey and Cerami, supra). Химерные и гуманизированные мышиные антитела против ФНО α прошли клиническую проверку для лечения ревматоидного артрита (см., например, Elliot M.J. et al. (1994); Lancet 344:1125-1127; Elliot M.J. et al. (1994) Lancet 344:1105-1110; Rankin E.C. et al. (1995) Br. J. Rheumatol. 34:334-342).

Человеческие антитела и фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут быть использованы для лечения аутоиммунных заболеваний, в частности, ассоциированных с воспалением, включая ревматоидный артрит, ревматоидный спондилит, остеоартрит и подагрический артрит, аллергию, рассеянный склероз, аутоиммунный диабет, аутоиммунный увеит и почечный синдром. В типичном случае антитело или фрагмент антитела применяются системно, хотя для некоторых нарушений может быть успешным местное применение антитела или фрагмента антитела в области воспаления (например, местное введение в суставы при ревматоидном артрите или наружное

применение при диабетических язвах, отдельно или в сочетании с производным циклогексанилидена, как описано в публикации РСТ No WO 93/19751). Антитело и фрагмент антитела, соответствующие изобретению, также могут применяться с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, используемыми при лечении аутоиммунных заболеваний, как описано далее в подразделе III.

C. Инфекционные болезни

Фактор некроза опухоли участвовал в появлении биологических эффектов, наблюдаемых при ряде инфекционных болезней. Например, ФНО α участвовал в развитии воспаления головного мозга и тромбозе капилляров и инфаркте при малярии. ФНО α также участвовал в развитии воспаления головного мозга, индукции разрушения гематоэнцефалического барьера, развитии синдрома септического шока и активации венозного инфаркта при менингите. ФНО α также участвовал в индукции кахексии, стимуляции пролиферации вирусов и образовании повреждений центральной нервной системы при синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД). Соответственно антитела и фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут быть использованы для лечения инфекционных болезней, включая бактериальный менингит (см., например, европейскую патентную заявку No EP 585705), церебральную малярию, СПИД и СПИД-ассоциированный комплекс (α C) (см., например, европейскую патентную заявку No EP 230574), а также вторичную инфекцию цитомегаловируса при трансплантации (см., например, Fietze E., et al. (1994) Transplantation 58:675-680). Антитела и фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут быть использованы для облегчения симптомов, ассоциированных с инфекционными болезнями, включая лихорадку и миалгии, обусловленные инфекцией (такой как грипп), и вторичную кахексию при инфекции (например, вторичную при СПИД или α C).

D. Трансплантация

Фактор некроза опухоли рассматривали как ключевой медиатор в отторжении трансплантата и болезни трансплантат против хозяина (GVHD) и в образовании побочной реакции, которую отмечали, когда крысиное антитело OKT3, направленное против комплекса Т-клеточный рецептор-CDR, использовали для ингибирования отторжения почечных трансплантатов (см., например, Eason J.D. et al. (1995) Transplantation 59:300-305; Suthanthiran M. and Strom T. B. (1994) New Engl. J. Med. 331:365-375). Соответственно антитела и фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут быть использованы для ингибирования отторжения трансплантата, включая отторжение аллотрансплантатов и ксенотрансплантатов, и для ингибирования GVHD. Хотя антитело или фрагмент антитела могут быть использованы отдельно, более предпочтительно их использование в комбинации с одним или более агентов, которые

ингибируют иммунный ответ против аллотрансплантата или ингибируют GVHD. Например, в одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела, соответствующего изобретению, используют в комбинации с одним или более антител, направленных на другие мишени, участвующие в регуляции иммунных ответов, такие как поверхностные молекулы клетки CD25 (рецептор- β интерлейкина-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) и/или CD86 (B7-2). В еще одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела, соответствующие изобретению, используют в комбинации с одним или более основных иммуносупрессирующих агентов, таких как циклоспорин А или FK506.

Е. Злокачественные новообразования

Фактор некроза опухоли участвовал в индукции кахексии, стимуляции роста опухоли, усилении метастатического потенциала и появлении цитотоксичности при злокачественных новообразованиях. Соответственно антитела или фрагменты антител, соответствующих изобретению, используют при лечении злокачественных новообразований для ингибирования роста опухоли или метастазов и/или для облегчения вторичной кахексии при злокачественных новообразованиях. Антитело или фрагмент антитела могут вводиться системно или местно в область опухоли.

Г. Легочные нарушения

Фактор некроза опухоли участвовал в патофизиологии респираторного дистресс-синдрома взрослых (α DS), включая стимуляцию активации эндотелиальных лейкоцитов, направленность цитотоксичности на пневмоциты и индукцию синдрома подтекания сосудов. Соответственно антитела или фрагменты антител, соответствующих изобретению, могут быть использованы при лечении различных легочных заболеваний, включая респираторный дистресс-синдром взрослых (см., например, публикацию PCT No WO 91/04054), легочный шок, хроническое легочное воспалительное заболевание, легочный саркоидоз, легочный фиброз и силикоз. Антитело или фрагмент антитела, соответствующие изобретению, могут вводиться с одним или более дополнительным терапевтическим агентом, используемым при лечении легочных нарушений, как описано ниже в подразделе III.

Г. Кишечные нарушения

Фактор некроза опухоли участвовал в патофизиологии воспалительных кишечных нарушений (см., например, Tracy K.J., et al. (1986) Science 234:470-474; Sun X-M., et al. (1988) J. Clin. Invest. 81:1328-1331; MacDonald T.T., et al. (1990) Clin. Exp. Immunol. 81: 301-305). Химерные мышиные антитела против ФНО α прошли клиническую проверку для лечения болезни Крона (van Dullemen H.M. et al. (1995) Gastroenterology 109:129-135). Человеческое антитело или фрагмент антитела, соответствующие изобретению, могут быть также использованы для лечения кишечных

нарушений, таких как идиопатическое воспалительное заболевание кишечника, которое включает два синдрома – болезнь Крона и язвенный колит. Антитело или фрагмент антитела, соответствующие изобретению, могут также вводиться с одним или более дополнительным терапевтическим агентом, используемым при лечении кишечных нарушений, как описано ниже в подразделе III.

Н. Сердечные нарушения

Антитела или фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут также быть использованы для лечения различных сердечных нарушений, включая ишемию сердца (см., например, европейскую патентную заявку No EP 453898) и сердечную недостаточность (слабость сердечной мышцы) (см., например, публикацию PCT No WO 94/20139).

I. Другие

Антитела или фрагменты антител, соответствующие изобретению, могут также быть использованы для лечения различных нарушений, при которых активность ФНО α является вредной. Примеры других заболеваний и нарушений, при которых активность ФНО α участвует в патофизиологии и которые таким образом могут лечиться с использованием антитела или фрагмента антитела, соответствующего изобретению, включают воспалительные костные нарушения и заболевания, связанные с резорбцией кости (см., например, Bertolini D.R., et al. (1986) *Nature* 319:516-518; Konig A., et al. (1988) *J. Bone Miner. Res.* 3:621-627; Lerner U.H. and Ohiin A. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 8:147-155 и Shanka G. and Stern P.H. (1993) *Bone* 14:871-876), гепатит, включая алкогольный гепатит (см., например, McClain C.J. and Cohen D.A. (1989) *Hepatology* 9:349-351; Felver M.E. et al. (1990) *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14:255-259 и Hansen J. et al. (1994) *Hepatology* 20:461-474), вирусный гепатит (Sheron N. et al. (1991) *J. Hepatol.* 12:241-245 и Hussain M.J. et al. (1994) *J. Clin. Pathol.* 47:1112-1115) и фульминантный гепатит; нарушения свертывания (см., например, van der Poll T. et al. (1990) *N. Engl. J. Med.* 322:1622-1627; van der Poll T. et al. (1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367:55-60; ожоги (см., например, Giroir B.P. et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 267:H118-124; Liu X.S. et al. (1994) *Burns* 20:40-44), реперфузионные повреждения (см., например, Scales W.E. et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 26:1122-1127; Serrick C. et al. (1994) *Transplantation* 58:1158-1162; Yao Y.M. et al. (1995) *Resuscitation* 29:157-168), формирование келоида (см., например, McCauley R. L et al. (1992) *J. Clin. Immunol.* 12:300-308), формирование рубцовой ткани; гипертермию, заболевания периодонта, ожирение и токсичность облучения.

«Терапевтически эффективным количеством» считается количество вводимого в процессе лечения терапевтического агента,

которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

Понятие «хроническое» применение относится к непрерывному (продолжительному) применению агента(ов) в противоположность острому (кратковременному) пути введения, так чтобы поддерживать первоначальное терапевтическое действие (активность) в течение длительного периода времени.

«Прерывистое» применение обозначает лечение, которое не осуществляют последовательно без перерывов, но которое скорее по своей природе является периодическим.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «иметь», «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «имеет», «имеющий», «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать, как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Подробное описание изобретения

Водная композиция

Настоящее изобретение относится к новым, улучшенным водным композициям, которые необязательно могут быть лиофилизированы, включающим подходящее количество рекомбинантного моноклонального антитела к $\text{ФНО}\alpha$, в подходящем(их) буфере(ах), один или нескольких подходящих стабилизаторов и других эксципиентов, которые выбраны из подходящих поверхностно-активных веществ и средств для поддержания изотоничности. Указанная композиция предотвращает образование агрегатов белка (антитела) и сохраняет эффективность и стабильность терапевтического соединения в течение желательного периода времени.

Адалимумаб и инфликсимаб являются примерами рекомбинантного моноклонального антитела к $\text{ФНО}\alpha$. Инфликсимаб представляет собой пример химерного антитела. Адалимумаб является примером человеческого антитела. В предпочтительном варианте осуществления используемые в композиции антитела представляют собой человеческие антитела. В более предпочтительном варианте осуществления используемые в композиции антитела представляют собой человеческие антитела против $\text{ФНО}\alpha$ человека. В еще одном варианте осуществления композиция включает D2E7 и комбинацию D2E7 с другими антителами. Антитело D2E7, известное под родовым наименованием как адалимумаб, с его высокой аффинностью связывания с $\text{ФНО}\alpha$, низкой кинетикой диссоциации и высокой нейтрализующей способностью. Адалимумаб доступен на фармацевтическом рынке под торговой маркой Хумира®. Используемые в настоящем описании названия адалимумаб и D2E7 представляют одно и то же моноклональное антитело человека. В

предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой адалимумаб или его антиген-связывающую часть.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные моноклональные антитела к ФНО α или их антиген-связывающие части обычно представлены в терапевтическом количестве, достигающем до 200 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 150 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет от примерно 50 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В еще более предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет примерно 100 мг/мл.

Рассматриваемая водная композиция включает подходящий буферный раствор в сочетании с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, которые стабилизируют данный фармацевтический препарат. Подходящие буферные растворы, которые могут быть использованы, выбирают из группы, которая известна специалистам и может быть найдена в литературе. В одном варианте осуществления подходящие буферные растворы включают, но не ограничиваются ими, буферный агент (или буферную систему) на основе ацетат-ионов. В предпочтительном варианте осуществления подходящий буфер включает ацетатный буфер. В еще более предпочтительном варианте осуществления ацетатный буфер выбирают из натрия ацетата тригидрата в сочетании с уксусной кислотой.

Буферные растворы в основном используют в концентрациях от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ. В предпочтительном варианте осуществления концентрация буфера составляет от примерно 1 мМ до примерно 50 мМ. В более предпочтительном варианте осуществления концентрация буфера составляет от примерно 1 мМ до примерно 20 мМ. В еще более предпочтительном варианте осуществления концентрация буфера составляет примерно 5 мМ.

В некоторых вариантах осуществления натрия ацетата тригидрат представлен в количестве, достигающем до 1.2 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество натрия ацетата тригидрата составляет от примерно 0.4 мг/мл до примерно 1.2 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество натрия ацетата тригидрата составляет от примерно 0.4 мг/мл до примерно 0.5 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество натрия ацетата тригидрата составляет 0.436 мг/мл.

В одном из вариантов осуществления жидкая композиция сохраняет величину рН в диапазоне от 4.0 до примерно 7.0 в зависимости используемого моноклонального антитела. В предпочтительном варианте осуществления используемый буфер

сохраняет величину рН композиции в диапазоне от примерно 4.5 до 6.0. В более предпочтительном варианте осуществления величина рН сохраняется на уровне примерно от 5.0 до 6.0. В более предпочтительном варианте осуществления величина рН сохраняется на уровне примерно 5.5.

Указанная водная композиция включает подходящие поверхностно-активные вещества, которые являются фармацевтически приемлемыми эксципиентами, используемыми для защиты белковых композиций от различных стрессовых воздействий, таких как перемешивание, сдвигающее усилие, высокая температура, замораживание и т.д. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, полисорбаты или полуксамеры, или комбинацию полисорбата и полуксамера. В предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом является полисорбат. В предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом являются полуксамер. В предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом являются комбинация полисорбата и полуксамера. В более предпочтительном варианте осуществления полисорбат представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80 (в том числе продаваемые под торговой маркой Tween® 20 или Tween® 80). В более предпочтительном варианте осуществления полуксамер представляет собой полуксамер 188 (в том числе продаваемый под торговой маркой Kolliphor P188®). В другом предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом является комбинация полисорбата 20 / полисорбата 80 и полуксамера 188.

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 20 представлен в количестве, достигающем до 10 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 20 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 20 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 20 составляет примерно 0.5 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 представлен в количестве, достигающем до 10 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 80 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 80 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 80 составляет примерно 0.5 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления полуксамер 188 представлен в количестве, достигающем до 10 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество полуксамера

188 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полуксамера 188 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полуксамера 188 составляет примерно 1.0 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления комбинация полисорбат 20 / полисорбата 80 и полуксамера 188 представлена в количестве, достигающем до 10 мг/мл полисорбата 80 и до 10 мг/мл полуксамера 188. В предпочтительном варианте осуществления количество полуксамера 188 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл и количество полисорбат 20 / полисорбата 80 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полуксамера 188 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл и количество полисорбат 20 / полисорбата 80 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбат 20 / полисорбата 80 составляет примерно 0.5 мг/мл и количество полуксамера 188 составляет примерно 1.0 мг/мл.

Водная композиция включает один или несколько подходящих стабилизаторов, которые являются фармацевтически приемлемыми эксципиентами и которые защищают фармацевтически активный ингредиент от химической и/или физической деградации в процессе производства, хранения и применения. В одном из вариантов осуществления стабилизаторы включают, но не ограничиваются ими, аминокислоты, олигосахариды, или их подходящие производные или смеси. В другом предпочтительном варианте осуществления подходящим стабилизатором является трегалоза. В другом предпочтительном варианте осуществления подходящим стабилизатором является пролин. В другом предпочтительном варианте осуществления подходящим стабилизатором является комбинация трегалозы и пролина. В другом предпочтительном варианте осуществления подходящим стабилизатором является комбинация трегалозы и аргинина.

В другом варианте осуществления олигосахариды, которые также могут быть использованы в качестве стабилизаторов, включают трегалозу.

В некоторых вариантах осуществления трегалоза представлена в количестве, достигающем до 150 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы составляет от примерно 25 мг/мл до примерно 150 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы составляет от примерно 50 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы дигидрата составляет примерно 80 мг/мл.

В другом варианте осуществления в качестве стабилизатора выбирают комбинацию трегалозы и аргинина. В некоторых вариантах осуществления трегалоза представлена в количестве, достигающем до 150 мг/мл, а аргинин в количестве, достигающем до 1.0 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы составляет от примерно 25 мг/мл до примерно 150 мг/мл, а количество аргинина от 0.05 до 1.0 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы составляет от примерно 50 мг/мл до примерно 100 мг/мл, а количество аргинина от 0.05 до 0.2 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы дигидрата составляет примерно 80 мг/мл, а количество аргинина гидрохлорида примерно 0.1 мг/мл.

В другом таком варианте осуществления аминокислота, которая может быть использована в качестве стабилизаторов представляет собой пролин.

В некоторых вариантах осуществления пролин представлен в количестве, достигающем до 40 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество пролина составляет от примерно 5 мг/мл до примерно 40 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество пролина составляет от примерно 20 мг/мл до примерно 35 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество пролина составляет примерно 27 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления комбинация трегалозы и пролина представлена в количестве, достигающем до 150 мг/мл трегалозы и до 40 мг/мл пролина. В предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы составляет от примерно 25 мг/мл до примерно 150 мг/мл и количество пролина составляет от примерно 5 мг/мл до примерно 40 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество трегалозы составляет от примерно 20 мг/мл до примерно 50 мг/мл и количество пролина составляет от примерно 10 мг/мл до примерно 20 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления, количество трегалозы дигидрата составляет примерно 40 мг/мл и количество пролина составляет примерно 13.5 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.0 – 6.0, от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полисорбата 20. В предпочтительном варианте осуществления водной композиции, рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб. В более предпочтительном варианте осуществления, композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл

трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.0 – 6.0, от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полисорбата 80. В предпочтительном варианте осуществления водной композиции рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80. В более предпочтительном варианте осуществления, композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах осуществления, водная композиция содержит от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.0 – 6.0, от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл поллоксамера 188. В предпочтительном варианте

осуществления рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб. В более предпочтительном варианте осуществления, композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188. В более предпочтительном варианте осуществления, композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1.0 мг/мл полоксамера 188. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1.0 мг/мл полоксамера 188.

Указанная композиция может, кроме того, дополнительно включать один или несколько других подходящих эксципиентов, которые хорошо известны специалистам в данной области.

Указанные выше композиции пригодны для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция сохраняет стабильность при хранении в том смысле, что в ней не происходит каких-либо дальнейших процессов агрегации белка или его модификаций в сравнении с показателем стабильности в нулевой временной точке.

Способы лечения и применение водной композиции

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения млекопитающего, включающему введение млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению, где у млекопитающего может присутствовать заболевание или нарушение, которые можно эффективно лечить адалимумабом.

В предпочтительном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека.

Заболевания или нарушения, которые можно лечить предоставляемыми композициями, в качестве неограничивающих примеров: активный ревматоидный артрит (среднетяжелый и тяжелый степени), активный псориатический артрит, активный анкилозирующий спондилит, хронический бляшечный псориаз (среднетяжелой или тяжелой степени), язвенный колит (среднетяжелой и тяжелой степени), аксиальный спондилоартрит, активный гнойный гидраденит, ювенильный идиопатический артрит, болезнь Крона (среднетяжелой или тяжелой степени), увеит,

активный энтезит-ассоциированный артрит. Дополнительные заболевания или нарушения, которые можно лечить композициями по настоящему изобретению, включают заболевания, описанные в патентах США № 6090382 и 8216583, соответствующие части которых включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Предоставляемые фармацевтические композиции можно вводить нуждающемуся в лечении индивидууму посредством системной инъекции, например, посредством внутривенной или подкожной, или внутримышечной инъекции; или посредством инъекции или нанесения на соответствующий участок, например, посредством прямой инъекции или прямого нанесения на участок, когда участок доступен при хирургическом вмешательстве; или посредством местного применения.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения и/или профилактики ревматоидного артрита, включающему введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества одной из предоставляемых композиций адалимумаба.

Терапевтически эффективное количество адалимумаба в предоставляемых композициях зависит от состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, предшествующей терапии и истории болезни пациента и реакции на терапевтическое средство. Подходящую дозу можно регулировать по решению лечащего врача так, что ее можно вводить пациенту один раз или посредством нескольких введений.

В одном из вариантов осуществления эффективное количество адалимумаба на дозу для взрослого составляет приблизительно от 1 – 500 мг/м², или приблизительно 1 – 200 мг/м², или приблизительно 1 – 40 мг/м² или приблизительно 5 – 25 мг/м².

Альтернативно, можно вводить постоянную дозу, количество которой может находиться в диапазоне 2 – 500 мг/дозу, 2 – 100 мг/дозу или приблизительно 10 – 80 мг/дозу.

Если дозу следует вводить более одного раза в неделю, иллюстративный диапазон доз является таким же, как указанные выше диапазоны доз или менее, и ее предпочтительно вводят два или более раз в неделю с диапазоном доз 25 – 100 мг/дозу.

В другом варианте осуществления приемлемая доза для введения посредством инъекции содержит 80 – 100 мг/дозу или, альтернативно, содержит 80 мг на дозу.

Дозу можно вводить раз в неделю, раз в две недели или разделять несколькими неделями (например, от 2 до 8).

В одном из вариантов осуществления адалимумаб вводят в дозе 40 мг посредством одной подкожной (п/к) инъекции.

В некоторых случаях улучшения состояния пациента можно добиться посредством введения дозы фармацевтической композиции приблизительно до 100 мг от одного до трех раз в неделю в течение

периода по меньшей мере трех недель. Для достижения желаемой степени улучшения может быть необходимым лечение в течение более длительных периодов. Для неизлечимых хронических состояний схему лечения можно продолжать бессрочно. Для пациентов детского возраста (возраст 4 – 17 лет) подходящая схема лечения может включать введение дозы адалимумаба от 0.4 мг/кг до 4 мг/кг один или несколько раз в неделю.

В другом варианте осуществления фармацевтические составы по изобретению можно получать в виде нерасфасованного состава, и по существу, компоненты фармацевтической композиции присутствуют в количествах выше, чем может требоваться для введения, и их соответствующим образом разбавляют до введения.

Фармацевтические композиции можно вводить в виде одного терапевтического средства или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами по мере необходимости. Таким образом, в одном из вариантов осуществления предоставляемые способы лечения и/или профилактика используют в комбинации с введением терапевтически эффективного количества другого активного средства. Другое активное средство можно вводить до, в течение или после введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Другое активное средство можно вводить как часть предоставляемой композиции или, альтернативно, в виде отдельного состава.

Введение предоставляемых фармацевтических композиций можно проводить различными способами, включая парентеральное, пероральное, буккальное, назальное, ректальное, интраперитонеальное, интрадермальное, трансдермальное, подкожное, внутривенное, внутриартериальное, внутрисердечное, внутрижелудочковое, внутричерепное, внутритрахеальное, интратекальное введение, внутримышечную инъекцию, внутривитреальную инъекцию и местное введение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению особенно пригодны для парентерального введения, т.е. подкожно, внутримышечно, внутривенно, интраперитонеально, в спинной мозг, в суставы, интрасиновиально и/или интратекально. Парентеральное введение можно проводить посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Фармацевтические композиции для инъекций могут находиться в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах, флаконах, преднаполненных шприцах или в контейнерах с несколькими дозами с добавленным консервантом, но не ограничиваясь этим. Кроме того, разработан ряд недавних подходов к доставке лекарственного средства, и фармацевтические композиции по настоящему изобретению подходят для введения этими новыми способами, например, Inject-ease®, Genject®, ручки-инжекторы, такие как GenPen®, и безыгольные устройства, такие как MediJector® и BioJector®. Фармацевтическую композицию по

настоящему изобретению также можно адаптировать для еще не открытых способов введения. Также см. Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Предоставляемые фармацевтические композиции также можно формулировать в качестве депо-препарата. Такие длительно действующие составы можно вводить посредством имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или посредством внутримышечной инъекции. Таким образом, например, составы можно модифицировать с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле), или ионообменных смол, или в виде умеренно растворимых производных, например, в виде умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции при желании можно предоставлять во флаконе, упаковке или в устройстве-распределителе, которые могут содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. В одном из вариантов осуществления устройство-распределитель может содержать шприц, содержащий однократную дозу жидкого состава, готового к инъекции. Шприц может сопровождаться инструкцией по введению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору или контейнеру, содержащим водную фармацевтическую композицию по изобретению. Концентрация полипептида в водной фармацевтической композиции может варьировать в широком диапазоне, но, как правило, в пределах диапазона приблизительно от 1 до приблизительно 200 мг/мл водного состава. Набор также может сопровождаться инструкциями по применению.

Способ получения

Способ получения вышеуказанных композиций включает добавление в водную фазу ацетатных буферных агентов, с последующим добавлением, в любой последовательности, следующих компонентов: осмолитика и/или стабилизатора, выбранного из группы: трегалозы, пролина или их сочетания, рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α , поверхностно-активного вещества, выбранного из группы: полисорбата 20, полисорбата 80, полксамера 188 или их сочетания.

Методики

1. Определение концентрации белка в исследуемых образцах.

Концентрацию белка определяли с помощью метода УФ-спектрофотометрии при длине волны 280 нм в планшетах для УФ-спектрофотометрии.

Каждый образец разводили раствором соответствующего плацебо до концентрации ~ 0.5 мг/мл. В лунку планшета для УФ-спектрофотометрии помещали 150 мкл разведенного образца. Измеряли оптическую плотность помещенных в планшет растворов на планшетном спектрофотометре

при длине волны 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий раствор плацебо.

Концентрацию белка (C) в мг/мл рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{A(280) * b}{\epsilon * l}$$

A_{280} – значение оптической плотности при длине волны 280 нм;

ϵ – коэффициент экстинкции исследуемого белка;

b – суммарный коэффициент разведения образца;

l – толщина слоя в лунке планшета; для 150 мкл $l = 0.42$ см.

2. Замена буферного раствора и концентрирование образцов.

Диафильтрацию и концентрирование образцов проводили в концентрационных ячейках Stirred Cell (Millipore) под давлением.

3. «ПЭГ-агрегация».

Приготовление растворов ПЭГ 6000.

Готовили раствор ПЭГ 6000 с массовой концентрацией 20 – 25% в исследуемом составе вспомогательных веществ. Итоговые растворы фильтровали через фильтр Durapore 0.45 мкм.

В 96-луночные планшеты для УФ-спектрофотометрии переносили расчетное количество образца, раствора вспомогательных веществ и 20 – 25 % раствора ПЭГ 6000 так, чтобы в каждой лунке была концентрация ПЭГ6000 от 0 до 18%, а концентрация белка в каждой лунке составляла 1 мг/мл. Все полученные в лунках растворы хорошо перемешивали, пипетируя.

После этого оценивали степень мутности растворов визуально, а также измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 400 нм. Чем менее стабилен образец, тем при меньшей концентрации ПЭГ 6000 он будет образовывать видимые агрегаты (опалесценцию). Степень мутности растворов также оценивали через сутки или несколько дней после приготовления растворов.

4. Определение гомогенности и точки агрегации белка с помощью метода динамического светорассеяния (DLS).

Определение гомогенности исследуемых образцов осуществляли на приборе Zetasizer Nano ZSP в режиме измерения Size. Для этого 0.05 мл раствора помещали в обеспыленную одноразовую пластиковую кювету.

- Аналитическая модель: Protein analysis.
- Выдерживание при температуре перед началом измерения 30 секунд.
- В каждой точке среднее значение по 13 измерениям в 3 повторностях.

Определение точки агрегации исследуемых белков осуществляли на приборе Zetasizer Nano ZSP. Для этого раствор помещали в кварцевую обеспыленную кювету, которую постепенно нагревали в приборе при постоянном измерении интенсивности рассеянного света в режиме измерения Temperature trend.

- Аналитическая модель: Protein analysis.

- Режим Temperature trend, mod: Protein aggregation point. От 50 до 85°C при шаге нагрева 1.5°C.
- Выдерживание при температуре перед началом измерения 30 секунд.
- В каждой точке среднее значение по 15 измерениям в 1 повторности.

Строили температурный тренд с помощью ПО прибора, которое и автоматически рассчитывает точку агрегации белка (Aggregation point).

5. Определение термической стабильности методом «Термостресс 50°C».

Исследуемые образцы разделяли на 2 части и помещали в отдельные пробирки: по 1 пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при +4°C, остальные устанавливали в термостат и инкубировали при 50°C в течение указанного времени. После окончания прогрева пробирки убирали из термостата, выдерживали при комнатной температуре около 15 мин и передавали на анализ согласно спецификации.

6. Определение коллоидной стабильности методом «шейк-тест».

Исследуемые образцы разделяли на 2 части по 200 мкл и помещали в стеклянные вials по 1 вiale на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при +4°C, остальные устанавливали в термошейкер и шейкировали со скоростью 800 об./мин при температуре 2 – 8°C в течение указанного времени. После окончания стресса пробирки убирали из термошейкера и передавали на анализ согласно спецификации.

7. Определение коллоидной стабильности методом криоконцентрирования.

Исследуемые образцы разделяли на 2 части и помещали в полимерные пробирки: по 1 пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при +4°C, остальные устанавливали в морозильную камеру и хранили при температуре минус 16 – 20 °C в течение указанного времени. После окончания стресса пробирки убирали из морозильной камеры, выдерживали при комнатной температуре до полного оттаивания содержимого, перемешивали растворы с помощью Vortex и передавали на анализ согласно спецификации.

8. Определение чистоты образцов с помощью метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭВЭЖХ).

Колонка Tosoh TSK-GelG3000SW_{XL} 7.8 mm ID × 30 cm, cat. № 08541.

Температура колонки: 25 °C

Скорость потока подвижной фазы: 0.7 мл/мин.

Объем вкола: 20 мкл.

Концентрация образца: 5 мг/мл.

Длина волны детектора: 220 нм.

Продолжительность элюирования: 23 мин.

Подвижная фаза: Динатрия гидрофосфат б/в 7.1 мг/мл.

Натрия хлорид 17.54 мг/мл.

pH подвижной фазы довели до 7.0 ортофосфорной кислотой.

9. Определение кислотно-щелочного профиля образцов на приборе Caliper LabChip GX II.

9.1. Приготовление образцов.

Образцы разводили до концентрации 1 мг/мл. К 200 мкл полученного раствора вносили 2 мкл раствора карбоксипептидазы В (СрВ) с концентрацией 5 мг/мл. Перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C. Испытуемые образцы отдиализовывали против трех смен воды в центрифужных пробирках Amicon Ultra и концентрировали до 2 мг/мл.

9.2. Приготовление рабочих растворов.

Рабочие растворы и планшет с анализируемыми образцами готовили в соответствии с методикой от производителя с использованием набора HT Protein Charge Variant Labeling Kit.

9.3. Подготовка чипа.

Подготовку чипа и пробирки с буфером проводили по методике от производителя с использованием буферных растворов из набора Protein Charge Variant Buffer Kit.

Запуск анализа является стандартной операцией. Метод анализа Protein Charge Variant 68s.

10. Определение чистоты образцов на приборе Caliper Labchip GX II в редуцирующих и нередуцирующих условиях.

10.1. Приготовление анализируемых образцов.

Для приготовления денатурирующего и восстанавливающего растворов использовали по 700 мкл HT Protein Express Sample Buffer с добавлением 24.5 мкл 1М DTT для буфера в редуцирующих условиях и 24.5 мкл 1М IAM для буфера в нередуцирующих условиях. Образцы разводили до концентрации 2 мг/мл. Для каждого образца готовили две микропробирки – в одну вносили 35 мкл денатурирующего буфера, в другую 35 мкл восстанавливающего буфера. Денатурировали образцы при 100°C в течение 5 минут. Перемешивали пробирки на вортексе, затем вносили 70 мкл воды в каждую пробирку и перемешивали. В 96-луночный планшет для анализа переносили по 44 мкл каждого образца.

10.2. Приготовление рабочих растворов и заполнение чипа.

Приготовление рабочих растворов и подготовку чипа проводили по стандартной методике с использованием набора HT Protein Express Reagent Kit. Запуск анализа является стандартной операцией. Метод анализа HT Protein Express 200.

11. Определение кислотно-щелочного профиля образцов с помощью ионно-обменной (ИО) ВЭЖХ.

Колонка: DIONEX ProPack WCX-10 4 мм x 250 мм
(Tosoh bioscience, Japan);
Предколонка: Dionex ProPack WCX-10G
Подвижная фаза: Элюент А: 0.01 М 2- (N-
морфолино)этансульфоновая кислота
(МЭСК), pH 6,0
Элюент В: 0.01 М МЭСК, 0.4 М натрия
хлорид, pH 5.5;
Объемвводимой пробы: 40 мкл;
Скорость потока: 0.5 мл/мин;
Температура колонки: 25°C;
Температура автосамплера: 5°C;
Длина волны детектора: 280 нм.
Градиент: Фаза А 95 – 0 – 95 %.

12. Определение чистоты методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в редуцирующих и нередуцирующих условиях.

Готовили ПААГ в стеклянных пластинах в присутствии натрия додецилсульфата, состоящие из концентрирующего слоя – 4% ПААГ и разделяющего слоя: в редуцирующих условиях – 12.5% ПААГ, в нередуцирующих условиях – 8 % ПААГ.

Собирали и устанавливали электрофорезную камеру в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора для проведения вертикального электрофореза. Пробы готовили, разводя образцы очищенной водой до конечной концентрации 1 мг/мл. Отбирали объем, эквивалентный 40 мкг и смешивали подготовленные пробы исследуемого образца в соотношении 3:1 (объем/объем) с буферным раствором для нанесения образцов 4-кратным, содержащим 2-меркаптоэтанол (редуцирующие условия) и не содержащим 2-меркаптоэтанол (нередуцирующие условия), перемешивали. Полученные растворы инкубировали при температуре $(99 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 3 мин (образцы, содержащие 2-меркаптоэтанол) и при температуре $(99 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 мин (образцы, не содержащие 2-меркаптоэтанол). Растворы охлаждали до комнатной температуры, перемешивали и наносили в лунки ПААГ под слой электродного буферного раствора.

Электрофорез проводили в режиме постоянного тока, используя систему водяного охлаждения. Задавали параметры работы источника питания: при прохождении фронта красителя через концентрирующий гель напряжение тока составляло 110 В. После вхождения фронта красителя в нижний разделяющий гель на 5 – 7 мм напряжение тока увеличивали до 180 В. Источник питания отключали, когда фронт красителя достиг нижней границы геля.

После окончания электрофореза гели отделяли от стекол и проводили фиксацию белков в фиксирующем растворе в течение 16 –

18 часов при комнатной температуре. Затем проводили окрашивание гелей (в растворе кислотном синем 83) и отмывку до получения четкой визуализации полос. Гели сканировали. Чистоту и примеси в испытуемых образцах оценивали с помощью программного обеспечения GelPro.

13. Определение специфической активности.

Специфическую активность образцов оценивали по способности специфично связывать и нейтрализовать ФНО α , который в свою очередь обладает цитотоксическим эффектом и вызывает гибель культуры WENI-13 var (фибросаркома, *Mus musculus*), вариантом культуры, который обладает повышенной чувствительностью к ФНО α в присутствии Актиномицина Д. Пробоподготовку образцов проводили с использованием роботизированной станции TecanEvo 200, в качестве СКО (среда количественного определения) использовали RPMI1640, 2 mM Gln, 10%FBS, актиномицин Д 2.5 мкг/мл, гентамицин 5 мкг/мл.

Исследуемый образец антитела разводили до 50 мкг/мл с шагом разведения не более 20 и помещали в роботизированную станцию. С помощью TecanEvo200 в культуральных планшетах проводили подготовку трех независимых разведений СО и ИО в диапазоне 10 000 – 0.5 нг/мл, к подготовленным разведениям вносили раствор ФНО α 500 пг/мл. Полученную смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 1 час.

После инкубации вносили клеточную суспензию WENI-13 var $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ кл/мл. Планшеты помещали в СО₂ инкубатор и инкубировали при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 5 % СО₂ в увлажненном воздухе в течение 20 – 24 ч.

По истечении срока инкубации вносили в культуральные планшеты витальный краситель Аламар Синий и инкубировали планшеты при тех же условиях до развития окраски. Оценивали интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения/испускания 544/590 нм при помощи прибора для считывания Infinite M200Pro. С помощью программного обеспечения Magellan 7.2 проводили построение кривых зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка; оценивали параллельность полученных кривых. Относительную специфическую активность исследуемых образцов определяли, как соотношение ED50 стандартного образца к ED50 испытуемого, выраженное в процентах.

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем

иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Примеры

Пример 1. Выбор природы буферного раствора.

Исследуемые составы.

В настоящем исследовании выбраны четыре буферных раствора, а также оригинальные составы препарата Хумира (для составов с содержанием белка 50 мг/мл и 100 мг/мл) в качестве контроля.

Хумира 1	Динатрия гидрофосфата дигидрат	1.530 мг/мл
	Натрия дигидрофосфата дигидрат	0.860 мг/мл
	Маннитол	12.0 мг/мл
	Лимонной кислоты моногидрат	1.305 мг/мл
	Полисорбат 80	1.0 мг/мл
	Натрия цитрат	0.305 мг/мл
	Натрия хлорид	6.165 мг/мл
	Натрия гидроксид	до pH 5.2
Хумира 2	Маннитол	42.0 мг/мл
	Полисорбат 80	1.0 мг/мл
Acet, pH 5.0	Натрия ацетат т/г	0.436 мг/мл
	Уксусная кислота лед.	до pH 5.0
Cit, pH 5.0	Натрия цитрат д/г	0.932 мг/мл
	Лимонная кислота б/в	0.352 мг/мл
His, pH 6.0	L-гистидин	0.40 мг/мл
	Гистидина гидрохлорид м/г	0.40 мг/мл
PB, pH 6.0	Натрия дигидрофосфат м/г	1.21 мг/мл
	Натрия гидрофосфат б/в	0.17 мг/мл

1.1. Определение коллоидной стабильности методом ПЭГ-агрегации.

Тест «ПЭГ-агрегация» проводили в трех повторностях для каждого образца. Анализ выполнен согласно методике 3. Данные средней оптической плотности растворов представлены в таблице 1. Результаты также представлены на Фиг. 1.

Таблица 1. Средняя оптическая плотность растворов после приготовления.

ПЭГ 6000, %	0 %	2 %	4 %	6 %	8 %	10 %	12 %	14 %	16 %	18 %
Acet, pH 5.0	0.0597	0.0519	0.0531	0.0593	0.0590	0.0598	0.0502	0.0513	0.0591	0.0608
Cit, pH 5.0	0.0582	0.0620	0.0620	0.0639	0.0626	1.0340	1.4279	1.4765	1.3668	1.4133
His, pH 6.0	0.0583	0.0615	0.0621	0.0634	0.0637	0.0664	0.0781	0.0847	1.3867	1.5628
PB, pH 6.0	0.0598	0.0619	0.0654	0.0656	0.0712	0.0903	1.3453	1.5324	1.4662	1.4297
Хумира 1	0.0563	0.0583	0.0594	0.0614	0.3095	0.9315	1.3162	1.3925	1.3986	1.4126
Хумира 2	0.0605	0.0579	0.0608	0.0834	0.0845	0.0685	0.0673	0.0658	0.0803	0.1320

 Наблюдается видимая агрегация

1.2. Определение термической стабильности по точке агрегации белка методом динамического светорассеяния (DLS).

Анализ выполнен согласно методике 4. Результаты представлены в таблице 2 и на Фиг. 4 – 8.

1.3. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5. Результаты представлены в таблице 2.

1.4. Результаты.

Таблица 2. Сводные результаты по выбору природы буферного раствора.

Состав	Термостресс 50°С, 24 ч		Видимая агрегация при ПЭГ 6000 % (Вид СФ)	Точка агрегации, °С (DLS)
	Прирост примесей, % (Э ВЭЖ)	Прирост фрагментов, % (Э ВЭЖ)		
Концентрация белка	5 мг/мл		1 мг/мл	
Acet, pH 5.0	0.02	0.01	> 18	74.0
Cit, pH 5.0	1.50	0.08	8	69.5
His, pH 6.0	0.75	0.20	14	69.5
PB, pH 6.0	0.55	0.11	10	71.0
Хумира 1	0.38	0.15	8	69.5
Хумира 2	0.02	0.01	> 18	72.5

 положительные результаты  отрицательные результаты  средние результаты

1.5. Выводы по примеру 1.

По результатам настоящего исследования рекомендуемый состав хранения (без учета дополнительных вспомогательных веществ):

Acet, pH 5.0	Натрия ацетат т/г 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0
--------------	--

Данный состав показал наилучшие стабилизирующие свойства среди всех исследуемых образцов: наименьший прирост примесей в ходе термостресса (0.02 % наравне с составом Хумира 2), отсутствие агрегации при 18 % ПЭГ 6000, а также самое высокое значение температуры агрегации (74°C).

Адалимуаб в составе Хумира 1 обладает меньшей термической стабильностью по сравнению с рекомендуемым составом. Минимальная коллоидная и термическая стабильность отмечена для состава на основе 5 мМ цитратного буферного раствора с pH 5.0.

Пример 2. Оптимизация pH и буферной емкости композиции.

По результатам первой части исследования наилучшую стабильность адалимумаб показал в ацетатном буферном растворе с pH 5.0. Как показал уровень техники, большинство патентов и патентных заявок на фармацевтические композиции, содержащие адалимумаб, защищают растворы с pH от 4.0 до 8.0. Таким образом, целью настоящего раздела было исследование возможности получения стабильных композиций, содержащих ацетат-ионы, с pH менее 4.

Исследуемые составы.

Обозначение	Концентрация, mM	pH
Acet 5 mM pH 6	5	6.0
Acet 5 mM pH 5.5	5	5.5
Acet 5 mM pH 5	5	5.0
Acet 5 mM pH 4	5	4.0
Acet 5 mM pH 3.75	5	3.75
Acet 5 mM pH 3.5	5	3.5
Acet 10 mM pH 6	10	6.0
Acet 10 mM pH 5.5	10	5.5
Acet 10 mM pH 5	10	5.0
Acet 10 mM pH 4	10	4.0
Acet 10 mM pH 3.75	10	3.75
Acet 10 mM pH 3.5	10	3.5
Acet 20 mM pH 6	20	6.0
Acet 20 mM pH 5.5	20	5.5
Acet 20 mM pH 5	20	5.0
Acet 20 mM pH 4	20	4.0
Acet 20 mM pH 3.75	20	3.75
Acet 20 mM pH 3.5	20	3.5

2.1. Определение коллоидной стабильности методом ПЭГ-агрегации.

Тест «ПЭГ-агрегация» проводили в трех повторностях для каждого образца. Анализ выполнен согласно методике 3. Данные средней оптической плотности растворов представлены в таблице 3. Результаты также представлены на Фиг. 2.

Таблица 3. Средняя оптическая плотность (400 нм) растворов после приготовления.

ПЭГ 6000, %	Acet 5 mM pH 6	Acet 5 mM pH 5.5	Acet 5 mM pH 5	Acet 5 mM pH 4	Acet 5 mM pH 3.75	Acet 5 mM pH 3.5	Acet 10 mM pH 6	Acet 10 mM pH 5.5	Acet 10 mM pH 5	Acet 10 mM pH 4
0 %	0.0341	0.0344	0.0299	0.0303	0.0312	0.0285	0.0365	0.0314	0.0289	0.0290
6 %	0.0346	0.0341	0.0293	0.0294	0.0290	0.0288	0.0315	0.0316	0.0316	0.0296
8 %	0.0344	0.0342	0.0290	0.0291	0.0295	0.0289	0.0355	0.0322	0.0312	0.0289
10 %	0.0346	0.0331	0.0298	0.0298	0.0297	0.0296	0.0344	0.0331	0.0299	0.0296
12 %	0.0348	0.0338	0.0302	0.0313	0.0319	0.0358	0.0371	0.0318	0.0303	0.0295
14 %	0.0361	0.0346	0.0313	0.0327	0.0331	0.0327	0.0367	0.0316	0.0313	0.0326
16 %	0.0359	0.0341	0.0341	0.0331	0.0333	0.0329	0.0346	0.0316	0.0339	0.0334
18 %	0.0348	0.0350	0.0308	0.0308	0.0310	0.0310	0.0344	0.0355	0.0307	0.0314

ПЭГ 6000, %	Acet 10 mM pH 3.75	Acet 10 mM pH 3.5	Acet 10 mM pH 3.5	Acet 20 mM pH 6	Acet 20 mM pH 5.5	Acet 20 mM pH 5	Acet 20 mM pH 4	Acet 20 mM pH 3.75	Acet 20 mM pH 3.5
0 %	0.0281	0.0292	0.0292	0.0344	0.0310	0.0295	0.0289	0.0289	0.0289
6 %	0.0292	0.0288	0.0288	0.0346	0.0322	0.0289	0.0304	0.0294	0.0285
8 %	0.0299	0.0337	0.0337	0.0381	0.0328	0.0292	0.0307	0.0296	0.0298
10 %	0.0295	0.0306	0.0306	0.0346	0.0316	0.0295	0.0291	0.0302	0.0312
12 %	0.0319	0.0321	0.0321	0.0346	0.0318	0.0300	0.0308	0.0301	0.0308
14 %	0.0309	0.0331	0.0331	0.0398	0.0320	0.0322	0.0312	0.0315	0.0306
16 %	0.0306	0.0320	0.0320	0.0361	0.0310	0.0325	0.0321	0.0315	0.0320
18 %	0.0313	0.0313	0.0313	0.0356	0.0311	0.0322	0.0321	0.0324	0.0362

2.2. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

2.3. Определение коллоидной стабильности методом шейк-тест.

Анализ выполнен согласно методике 6.

2.4. Определение коллоидной стабильности методом криоконцентрирования.

Анализ выполнен согласно методике 7.

Общие результаты представлены в таблице 4, где наглядно отражены показатели качества образцов до и после термостресса, шейк-теста и криоконцентрирования.

2.5. Результаты.

Таблица 4. Сводные результаты показателей качества образцов до и после стрессов.

	Входной контроль				
	рН плацебо	рН после диализа	Δ рН после диализа	С белка, мг/мл	Мутность, ОП 400 нм
					Вид-Сф
5 mM acet рН 6.0	6.00	6.10	0.10	10	0.0506
10 mM acet рН 6.0	6.00	6.06	0.06	10	0.0531
20 mM acet рН 6.0	6.00	6.04	0.04	10	0.0511
5 mM acet рН 5.5	5.50	5.60	0.10	10	0.0513
10 mM acet рН 5.5	5.50	5.53	0.03	10	0.0531
20 mM acet рН 5.5	5.50	5.51	0.01	10	0.0514
5 mM acet рН 5.0	5.00	5.15	0.15	10	0.0504
10 mM acet рН 5.0	5.00	5.12	0.12	10	0.0501
20 mM acet рН 5.0	5.00	5.09	0.09	10	0.0488
5 mM acet рН 4.0	4.00	4.35	0.35	10	0.0446
10 mM acet рН 4.0	4.00	4.22	0.22	10	0.0471
20 mM acet рН 4.0	4.00	4.20	0.20	10	0.0489
5 mM acet рН 3.75	3.75	4.04	0.29	10	0.0504
10 mM acet рН 3.75	3.75	4.01	0.26	10	0.0501
20 mM acet рН 3.75	3.75	3.95	0.20	10	0.0473
5 mM acet рН 3.5	3.50	3.90	0.40	10	0.0511
10 mM acet рН 3.5	3.50	3.84	0.34	10	0.0476
20 mM acet рН 3.5	3.50	3.79	0.29	10	0.0492

 положительные результаты
  отрицательные результаты
 средние результаты / исходные данные

Таблица 5. Продолжение.

	Термостресс 50°C, 96 ч					Шейк-тест 800 об./мин, 96ч					
	Δ pH*	Изменение чистоты*, %		Мутность, 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %**	Δ pH*	Изменение чистоты*, %		Мутность, ОП 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %**	
		Э ВЭХ	Caliper З#, ред.	Caliper З#, перед.	Э ВЭХ		Caliper З#, ред.	Caliper З#, перед.			
5 mM acet pH 6.0	0.03	-0.58	-1.88	-0.81	0.0445	0.03	-0.26	-0.43	-0.03	0.0490	2.66
10 mM acet pH 6.0	0.04	-0.66	-1.94	-0.94	0.0479	0.05	-0.31	-0.67	-0.19	0.0471	3.41
20 mM acet pH 6.0	0.01	-0.74	-2.09	-1.53	0.0387	0.02	-0.38	-0.36	-0.11	0.0469	3.98
5 mM acet pH 5.5	0.05	-0.47	-1.74	-1.01	0.0455	0.04	-0.22	-0.39	-0.55	0.0413	1.35
10 mM acet pH 5.5	0.06	-0.76	-1.61	-0.76	0.0489	0.06	-0.28	-0.67	-0.51	0.0482	1.55
20 mM acet pH 5.5	0.03	-0.98	-2.33	-0.81	0.0494	0.05	-0.31	-0.75	-0.63	0.0460	1.45
5 mM acet pH 5.0	0.00	-0.68	-1.99	-1.13	0.0306	0.07	-0.33	-1.17	-0.49	0.0480	2.45
10 mM acet pH 5.0	0.05	-0.79	-2.06	-0.07	0.0327	0.06	-0.50	-1.07	-0.55	0.0493	3.22
20 mM acet pH 5.0	0.03	-0.91	-0.65	-1.90	0.0327	0.03	-0.51	-0.39	-0.21	0.0520	7.02
5 mM acet pH 4.0	-0.05	-2.00	-2.67	-0.53	0.0394	0.05	-0.24	-1.45	-2.05	0.0466	1.51
10 mM acet pH 4.0	0.03	-2.57	-2.55	-1.63	0.0307	0.07	-0.29	-0.91	-0.45	0.0505	3.44
20 mM acet pH 4.0	-0.03	-2.86	-3.24	-0.99	0.0311	0.01	-0.40	-1.31	-0.85	0.0397	2.80
5 mM acet pH 3.75	-0.01	-3.32	-5.00	-2.63	0.0352	0.07	-0.42	-1.33	-1.41	0.0484	0.35
10 mM acet pH 3.75	0.02	-3.09	-2.62	-2.50	0.0388	0.10	-0.31	-0.15	-0.47	0.0453	1.25
20 mM acet pH 3.75	0.01	-4.09	-2.36	-3.23	0.0325	0.05	-0.51	-1.21	-0.37	0.0501	0.37
5 mM acet pH 3.5	0.00	-4.28	-5.50	-2.72	0.0389	0.08	-0.38	-2.13	-1.03	0.0465	0.76
10 mM acet pH 3.5	0.02	-4.61	-6.22	-2.88	0.0394	0.10	-0.39	-0.01	-0.50	0.0471	3.78
20 mM acet pH 3.5	-0.05	-6.97	-7.92	-3.11	0.0300	0.02	-0.67	-0.63	-0.01	0.0492	2.67

Таблица 5. Продолжение.

Заморозка -20°C, разморозка +25°C						
Δ pH*	Изменения чистоты, %			Вид-Сф	Мутность, ОП 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. §**
	э вэжж	Caliper ЭФ, ред.	Caliper ЭФ, перед.			
5 mM acet pH 6.0	-0.24	-0.44	-0.21	0.0487	0.0487	3.11
10 mM acet pH 6.0	-0.31	-0.74	-0.38	0.0493	0.0493	3.54
20 mM acet pH 6.0	-1.23	-0.59	-0.36	0.0511	0.0511	4.11
5 mM acet pH 5.5	-0.39	-0.56	-0.31	0.0486	0.0486	2.66
10 mM acet pH 5.5	-0.60	-0.41	-0.28	0.0473	0.0473	2.19
20 mM acet pH 5.5	-0.45	-0.09	-0.41	0.0480	0.0480	4.01
5 mM acet pH 5.0	-0.20	-0.46	-0.38	0.0494	0.0494	2.67
10 mM acet pH 5.0	-0.49	-0.87	+1.09	0.0468	0.0468	4.46
20 mM acet pH 5.0	-0.59	-0.08	-0.09	0.0536	0.0536	3.69
5 mM acet pH 4.0	-1.29	-0.75	+0.99	0.0475	0.0475	2.06
10 mM acet pH 4.0	-1.77	-2.11	-0.79	0.0449	0.0449	3.18
20 mM acet pH 4.0	-1.62	+0.73	+0.72	0.0513	0.0513	4.54
5 mM acet pH 3.75	-1.49	-1.74	-0.01	0.0463	0.0463	3.07
10 mM acet pH 3.75	-1.76	-1.68	+0.70	0.0473	0.0473	3.02
20 mM acet pH 3.75	-2.16	+2.42	+1.03	0.0544	0.0544	4.70
5 mM acet pH 3.5	-1.22	-2.09	+0.72	0.0479	0.0479	2.60
10 mM acet pH 3.5	-1.97	-1.59	+0.07	0.0492	0.0492	6.83
20 mM acet pH 3.5	-2.98	-1.13	+1.02	0.0427	0.0427	4.88

* Изменение рассчитывали по формуле Δ = (значение после стресса - значение до стресса) ** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле Δ = [содержание кисл. фракции до стресса - содержание кисл. фракции после стресса] + [содержание щел. фракции до стресса - содержание щел. фракции после стресса] + [содержание доминир. фракции до стресса - содержание доминир. фракции после стресса]

положительные результаты

отрицательные результаты

средние результаты / исходные данные

2.6. Выводы по примеру 2.

- В результате исследования показано, что присутствие адалимумаба в кислых растворах плацебо приводит к значительному увеличению уровня pH. Помимо этого, композиции с pH менее 5.0 продемонстрировали неудовлетворительную стабильность в ходе диализа (низкая чистота на Labchip Caliper в редуцирующих условиях) и термостресса (низкая чистота после стресса на всех используемых методах анализа).

- Наиболее стабильным образцом среди всех исследуемых является адалимумаб в 5 мМ ацетатном буферном растворе с pH 5.0 – 6.0. Они продемонстрировали минимальное изменение чистоты, а также кислотно-щелочного профиля в ходе стрессов. Однако для создания композиции адалимумаба возможно использование растворов с большей буферной емкостью.

Пример 3. Выбор осмотического агента и стабилизаторов.

По результатам первой части исследования наилучшую стабильность адалимумаб показал в ацетатном буферном растворе с pH 5.0 – 6.0. Состав с pH 5.5 был взят за основу для выбора осмотического агента и стабилизаторов.

Исследуемые составы.

Хумира 1	Динатрия гидрофосфата дигидрат 1.530 мг/мл Натрия дигидрофосфата дигидрат 0.860 мг/мл Маннитол 12.0 мг/мл Лимонной кислоты моногидрат 1.305 мг/мл Полисорбат 80 1.0 мг/мл Натрия цитрата дигидрат 0.305 мг/мл Натрия хлорид 6.165 мг/мл Натрия гидроксид до pH 5.2
Хумира 2	Маннитол 42.0 мг/мл Полисорбат 80 1.0 мг/мл
Acet, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5
Acet + NaCl, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Хлорид натрия 9 мг/мл
Acet + Tre, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Трегалозы дигидрат 100 мг/мл
Acet + Suc, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Сахароза 100 мг/мл
Acet + Mannitol, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Маннитол 50 мг/мл
Acet + Sorb, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Сорбитол 50 мг/мл

Acet + 100mM Gly , pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Глицин 7.5 мг/мл
Acet + 50 mM Arg, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Аргинина гидрохлорид 10.5 мг/мл
Acet + 10 mM Meth, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Метионин 1.5 мг/мл
Acet + 250 mM Prol, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 L-Пролин 27.0 мг/мл
Acet + 10 mM EDTA, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 ЭДТА динатриевая соль дигидрат 3.72 мг/мл
Acet + 100mM Lys, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Лизин 14.6 мг/мл
Acet + 100mM Guan, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Гуанидина гидрохлорид 9.55 мг/мл
Acet + 100mM Glu, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Глюкозы моногидрат 19.82 мг/мл
Acet + 100mM Lact, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Лактозы моногидрат 36.03 мг/мл
Acet + 100mM Mannose, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Манноза 18.02 мг/мл
Acet + Tre + 0. Cyst, pH 5.5	Натрия ацетат тригидрат 0.436 мг Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Трегалозы дигидрат 100 мг Цистеина гидрохлорид моногидрат 0.088 мг
Acet + Tre + 2. Cyst, pH 5.5	Натрия ацетат тригидрат 0.436 мг Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Трегалозы дигидрат 100 мг Цистеина гидрохлорид моногидрат 0.44 мг
Acet + 10mM Cyst, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Цистеина гидрохлорид моногидрат 1.76 мг/мл
Acet + Tween20 0.5, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 20 0.5 мг/мл
Acet + Tween20 1.0, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 20 1.0 мг/мл

Acet + Tween80 0.5, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 80 0.5 мг/мл
Acet + Tween80 1.0, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 80 1.0 мг/мл
Acet + Pol.188 0.5, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полоксамер 188 0.5 мг/мл
Acet + Pol.188 1.0, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полоксамер 188 1.0 мг/мл

3.1. Определение коллоидной стабильности методом ПЭГ-агрегации.

Тест «ПЭГ-агрегация» проводили в трех повторностях для каждого образца. Анализ выполнен согласно методике 3. Данные средней оптической плотности растворов представлены в таблице 6. Результаты также представлены на Фиг. 3.

Таблица 6. Средняя оптическая плотность растворов адалимумаба после приготовления.

ПЭГ %	0.5 Tween 20	1 Tween 20	0.5 Tween 80	1 Tween 80	0.5 Pol.188	1 Pol.188	NaCl	Tre	Mann	Sorb	Suc
0	0.0648	0.0638	0.0714	0.0733	0.0588	0.0599	0.0737	0.0599	0.0699	0.0599	0.0621
6	0.0632	0.0654	0.0687	0.0755	0.0552	0.0566	0.0570	0.0638	0.0664	0.0614	0.0649
8	0.0620	0.0658	0.0654	0.0769	0.0590	0.0565	0.0622	0.0661	0.0652	0.0582	0.0646
10	0.0674	0.0670	0.0700	0.0776	0.0644	0.0669	0.2339	0.0630	0.0600	0.0615	0.0696
12	0.0649	0.0671	0.0704	0.0754	0.0650	0.0673	0.7066	0.0663	0.0637	0.0611	0.0700
14	0.0660	0.0709	0.0704	0.0819	0.0668	0.0710	1.2027	0.0733	0.0633	0.0618	0.0727
16	0.0663	0.0703	0.1049	0.1479	0.0687	0.0660	1.2339	0.0660	0.0620	0.0623	0.0733
18	0.0674	0.0707	0.1230	0.1681	0.0689	0.0773	1.2754	0.0621	0.0658	0.0620	0.0760

ПЭГ %	Gly	Arg	Meth	Prol	EDTA	Lys	Guan	Glu	Lact	Mannose	10Cyst
0	0.0611	0.0863	0.0581	0.0650	0.0561	0.0698	0.0636	0.0529	0.0693	0.0582	0.0616
6	0.0613	0.0613	0.0567	0.0696	0.0573	0.0697	0.0525	0.0565	0.0610	0.0601	0.0650
8	0.0646	0.0614	0.0620	0.0722	0.0584	0.0723	0.0606	0.0563	0.0623	0.0613	0.0670
10	0.0682	0.0700	0.0676	0.0734	0.6950	0.0765	0.0565	0.0573	0.0650	0.0633	0.0733
12	0.0710	0.0687	0.0645	0.0798	1.0355	0.0855	0.2242	0.0593	0.0663	0.0612	0.0708
14	0.0726	0.0769	0.0657	0.0837	1.0964	0.8867	0.9068	0.0611	0.0663	0.0638	0.0836
16	0.0739	0.9483	0.0676	0.0863	1.2935	1.2942	1.3112	0.0618	0.0668	0.0630	0.0758
18	0.0777	1.2383	0.0775	0.0869	1.3199	1.4338	1.4138	0.0585	0.0673	0.0657	0.0728

Наблюдается видимая агрегация

3.2. Определение термической стабильности по точке агрегации белка методом динамического светорассеяния (DLS).

Анализ выполнен согласно методике 4.

3.3. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

3.4. Результаты.

Таблица 7. Сводные результаты показателей качества образцов до и после стрессов.

	С белка, мг/мл	Термостресс 50°C, 72 ч				Температура агрегации, °C	Агрегация при % ПЭГ 6000	Вывод
		Изменение чистоты, %	Прирост фрагментов, %	Мутность, ОП 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %			
Хумира 1	5	-1.10	0.94	0.0544	21.44	69.5***	8	
Хумира 2	5	-0.18	0.10	0.0487	18.38	72.5	> 18	
Acet	5	-0.46	0.43	0.0464	17.01	74.0	16	
Acet + NaCl	5	-2.03	1.86	0.0457	22.05	66.5***	10	
Acet + Tre	5	-0.28	0.15	0.0581	14.55	75.5	> 18	+
Acet + Suc	5	-0.46	0.34	0.0505	19.78	74.0	> 18	
Acet + Mannitol	5	-0.48	0.30	0.0521	19.03	75.5	> 18	
Acet + Sorb	5	-0.53	0.34	0.0574	20.78	75.5	> 18	
Acet + 100mM Gly	5	-0.39	0.20	0.0457	20.70	74.0	> 18	+
Acet + 50 mM Arg	5	-1.31	1.15	0.0497	14.90	69.5***	16	+
Acet + 10 mM Meth	5	-0.42	0.34	0.0432	16.27	-	> 18	+
Acet + 250 mM Prol	5	-0.38	0.27	0.0448	15.43	74.0	> 18	+
Acet + 10 mM EDTA	5	-1.24	0.72	0.0488	12.08	68.0***	10	
Acet + 100mM Lys	5	-3.26	2.19	0.0424	17.67	68.0***	14	
Acet + 100mM Guan	5	-3.98	2.36	0.0480	17.51	66.5***	12	
Acet + 100mM Glu	5	-1.60	1.54	0.0496	55.64	74.0	> 18	
Acet + 100mM Lact	5	-1.86	1.60	0.0457	29.43	74.0	> 18	
Acet + 100mM Mannose	5	-1.73	1.57	0.0450	44.16	74.0	> 18	

	С белка, мг/мл	Термостресс 50°С, 72 ч				Температура агрегации, °С	Агрегация при 6000 нЭГ	Вывод
		Изменение чистоты, %	Прирост фрагментов, %	Мутность, ОП 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %			
Acet + 0. Cyst	5	-5.08	3.55	0.0425	-	-	-	
Acet + 2. Cyst	5	-8.99	5.78	0.0440	-	-	-	
Acet + 10mM Cyst	5	-100	93.20	0.0467	-	-	> 18	
Acet + Tween20 0.5	5	-	-	0.0425	19.25	74.0***	> 18	+
Acet + Tween20 1.0	5	-0.41	0.33	0.0452	20.72	74.0***	> 18	+
Acet + Tween80 0.5	5	-0.46	0.39	0.0475	19.52	72.5***	> 18	+
Acet + Tween80 1.0	5	-0.48	0.31	0.0436	17.36	72.5***	> 18	+
Acet + Koll 0.5	5	-0.31	0.30	0.0452	17.65	74.0	> 18	+
Acet + Koll 1.0	5	-0.40	0.44	0.0487	19.46	74.0	> 18	+

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$ ** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле $\Delta = \{ \text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса} \} + \{ \text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса} \} + \{ \text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса} \}$

*** Наблюдается заметная агрегация при нагревании (резкий скачок размера частиц и интенсивности рассеянного света > 10000 kcps).

положительные результаты отрицательные результаты средние результаты / исходные данные

3.5. Выводы по примеру 3.

На основании результатов настоящего исследования перспективными вспомогательными веществами для композиций адалимумаба являются: трегалозы дигидрат, глицин, пролин, метионин и аргинина гидрохлорид. В качестве поверхностно-активных веществ для скрининга финальной фармацевтической композиции взяты: полисорбат 80, полисорбат 20, полксамер 188.

Негативное влияние на коллоидную стабильность адалимумаба оказывают: хлорид натрия, аргинин, ЭДТА, лизин, гуанидин.

Негативное влияние на термическую стабильность адалимумаба оказывают: хлорид натрия, лизин, гуанидин. К полной фрагментации антитела приводит содержание в составе цистеина. Отмечено смещение кислотно-щелочного профиля белка при введении в состав вспомогательного вещества ЭДТА.

Пример 4. Выбор финальной фармацевтической композиции.

По результатам третьей части исследования в качестве перспективных вспомогательных веществ были выбраны: трегалозы дигидрат, глицин, пролин, метионин и аргинина гидрохлорид. В качестве поверхностно-активных веществ для скрининга финальной фармацевтической композиции взяты: полисорбат 80, полисорбат 20, полксамер 188.

Исследуемые составы (мг/мл).

№	Буферный раствор	Конц. белка	Трегалозы д/г	L-Пролин	Глицин	Метионин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полксамер 188	Аргинина г/х
1		15	Состав Хумира 1 (см. п. 1)							
2		15	Состав Хумира 2 (см. п. 1)							
3	Ацетатный буферный раствор, pH 5.5	15	80							
4		15	80				0.1			
5		15	80				0.5			
6		15	80				1.0			
7		15	80					0.1		
8		15	80					1.0		
9		15	80						0.1	
10		15	80						0.5	
11		15	80						1.0	
12		15	80							0.5
13		15	80				0.1			0.5
14		15	80				0.5			0.5
15		15	80				1.0			0.5
16		15	80					0.1		0.5
17		15	80					1.0		0.5
18		15	80						0.1	0.5
19		15	80						0.5	0.5
20		15	80						1.0	0.5

№	Буферный раствор	Конц. бенка	Трегалозы д/г	L-Пролин	Глицин	Метионин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксамер 188	Аргинина г/х
21		15		27						
22		15		27			0.1			
23		15		27			0.5			
24		15		27			1.0			
25		15		27				0.1		
26		15		27				1.0		
27		15		27					0.1	
28		15		27					0.5	
29		15		27					1.0	
30		15		8.0	7.5					
31		15		8.0	7.5		0.1			
32		15		8.0	7.5		0.5			
33		15		8.0	7.5		1.0			
34		15		8.0	7.5			0.1		
35		15		8.0	7.5			1.0		
36		15		8.0	7.5				0.1	
37		15		8.0	7.5				0.5	
38		15		8.0	7.5				1.0	
39		15		27		1.5				
40		15		27		1.5	0.1			
41		15		27		1.5	0.5			
42		15		27		1.5	1.0			
43		15		27		1.5		0.1		
44		15		27		1.5		1.0		
45		15		27		1.5			0.1	
46		15		27		1.5			0.5	
47		15		27		1.5			1.0	
48		15	40	13.5						
49		15	53.3	9.0						
50		15	26.7	18						

4.1. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

4.2. Определение коллоидной стабильности методом шейк-тест.

Анализ выполнен согласно методике 6.

4.3. Определение коллоидной стабильности методом криоконцентрирования.

Анализ выполнен согласно методике 7.

Общие результаты представлены в таблицах 8 и 9, где отражены показатели качества образцов до и после термостресса, шейк-теста и криоконцентрирования.

4.4. Результаты.

Таблица 8. Сводные результаты Э ВЭХХ и Уф-спектроскопии образцов до и после стрессов.

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл								Изменение чистоты Э ВЭЖХ, %*				Мутность, ОП 400 нм		
	anti ФНО α	Треталон Д/ч	L-Пролин	Глицин	Метонин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксмер 188	Аргинина г/х	Термострес с, 50°C, 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	Шейк- тест 120 ч	Шейк- тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	
1	15	Состав Хумира 1 (см. п. 1)									-1.12	0.02	0.03	0.0410	0.0501
2	15	Состав Хумира 2 (см. п. 1)									-0.38	-7.49	0.02	0.0408	0.0503
3	15	80								-0.33	0.04	0.03	0.0409	0.0521	
4	15	80				0.1				-0.34	-0.09	-0.09	0.0446	0.0479	
5	15	80				0.5				-0.35	-0.04	-0.02	0.0406	0.0531	
6	15	80				1.0				-0.38	-0.04	-0.21	0.0407	0.0489	
7	15	80					0.1			-0.39	0.05	0.07	0.0413	0.0474	
8	15	80					1.0			-0.44	0.07	-0.01	0.0454	0.0465	
9	15	80						0.1		-0.54	0.02	-0.07	0.0465	0.0494	
10	15	80						0.5		-0.45	-0.09	-0.18	0.0465	0.0516	
11	15	80						1.0		-0.56	-0.04	0.05	0.0412	0.0494	
12	15	80							0.1	-0.40	-0.03	0.08	0.0448	0.0446	
13	15	80				0.1			0.1	-0.44	0.03	-0.07	0.0479	0.0468	
14	15	80				0.5			0.1	-0.46	-0.09	-0.09	0.0445	0.0510	
15	15	80				1.0			0.1	-0.49	-0.01	0.07	0.0434	0.0512	
16	15	80					0.1		0.1	-0.47	0.05	0.08	0.0445	0.0455	
17	15	80					1.0		0.1	-0.33	0.04	0.07	0.0478	0.0444	
18	15	80						0.1	0.1	-0.46	0.09	0.05	0.0497	0.0447	
19	15	80						0.5	0.1	-0.48	-0.01	0.01	0.0441	0.0518	
20	15	80						1.0	0.1	-0.40	-0.01	0.03	0.0434	0.0470	

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл								Изменение чистоты Э ВЭЖХ, %				Мутность, ОП 400 нм	
	Антисептик	Третичамина	Л-пролин	Глицерин	Метформин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксмер 188	Адипинат г/х	Термострес-с, 50°C, 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	Жейк-тест 120 ч	Жейк-тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C
21	15		27							-0.36	0.00	0.02	0.0400	0.0409
22	15		27			0.1				-0.51	-0.03	-0.06	0.0440	0.0475
23	15		27			0.5				-0.78	-0.03	-0.04	0.0464	0.0745
24	15		27			1.0				-0.39	0.03	0.01	0.0445	0.0443
25	15		27				0.1			-0.46	-0.01	0.08	0.0412	0.0457
26	15		27				1.0			-0.48	-0.07	-0.07	0.0434	0.0476
27	15		27					0.1		-0.66	-0.09	0.00	0.0445	0.0449
28	15		27					0.5		-0.36	-0.04	0.06	0.0410	0.0469
29	15		27					1.0		-0.39	0.02	0.06	0.0409	0.0501
30	15		8.0	7.5						-0.46	-0.02	0.00	0.0402	0.0467
31	15		8.0	7.5		0.1				-0.48	-0.05	-0.01	0.0403	0.0439
32	15		8.0	7.5		0.5				-0.40	-0.04	-0.01	0.0412	0.0496
33	15		8.0	7.5		1.0				-0.20	0.02	0.08	0.0555	0.0474
34	15		8.0	7.5			0.1			-0.46	-0.01	-0.03	0.0585	0.0479
35	15		8.0	7.5			1.0			-0.37	0.01	-0.02	0.0565	0.0443
36	15		8.0	7.5				0.1		-0.49	-0.02	0.04	0.0408	0.0457
37	15		8.0	7.5				0.5		-0.36	-0.01	0.06	0.0478	0.0464
38	15		8.0	7.5				1.0		-0.31	0.00	0.03	0.0432	0.0498
39	15		27		1.5					-0.36	0.01	-0.01	0.0512	0.0463
40	15		27		1.5	0.1				-0.38	0.06	0.05	0.0509	0.0503
41	15		27		1.5	0.5				-0.36	-0.01	0.08	0.0549	0.0417
42	15		27		1.5	1.0				-0.30	0.01	0.04	0.0520	0.0473

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл								Изменение чистоты Э ВЭЖХ, %*				Мутность, ОП 400 нм	
	anti #102	Третичная амина	1-пропан	Глицерин	Метформин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Поноксампер 188	Аргинина г/х	Термострес-с, 50°C, 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	Жейк-тест 120 ч	Жейк-тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C
43	15	27			1.5		0.1			-0.37	0.00	-0.08	0.0512	0.0444
44	15	27			1.5		1.0			-0.32	-0.03	0.03	0.0513	0.0465
45	15	27			1.5			0.1		-0.33	-0.01	-0.03	0.0510	0.0411
46	15	27			1.5			0.5		-0.36	-0.02	-0.02	0.0550	0.0477
47	15	27			1.5			1.0		-0.32	0.01	-0.03	0.0552	0.0498
48	15	40	13							-0.50	-0.09	-0.08	0.0494	0.0469
49	15	53.3	9							-0.55	-0.01	0.03	0.0414	0.0464
50	15	26.7	18							-0.59	-0.02	-0.03	0.0410	0.0466

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$ отрицательные результаты
 средние результаты / исходные данные

 положительные результаты
 отрицательные результаты

Таблица 9. Сводные результаты кислотно-щелочного профиля образцов на приборе LabChip и гомогенности методом динамического светорассеяния до и после стрессов.

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл								Гомогени- ость DLS, % (по интенсив- ности)	Гомогенность DLS после стрессов, %				Суммарное изменение кислотно-щелочного профиля по модулю**, %			
	Энт- ифи- кация	Третинол н/г	L-Пролин	Глицерин	Метформин	Полноробот 0.5	Полноробот 2.0	Полноробот 1.0		Термо- стресс, 50°C, 120 ч	Шейк- тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	Термо- стресс, +50°C 120 ч	Шейк- тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C		
1	15	80	Состав Хумира 1 (см. п. 1)								100	99.6	100	33.16	1.13	1.84	
2	15	80	Состав Хумира 2 (см. п. 1)								98.8	96.0	80.1	29.55	1.03	2.88	
3	15	80							100	100	93.3	100	24.56	2.88	2.46		
4	15	80				0.1			100	100	93.6	100	27.26				
5	15	80				0.5			100	100	94.8	100	28.27	1.09	2.82		
6	15	80				1.0			100	100	96.9	100	27.64				
7	15	80					0.1		100	100	97.0	100	24.10				
8	15	80					1.0		100	98.5	98.8	100	26.17				
9	15	80						0.1	100	100	98.6	100	26.26				
10	15	80						0.5	100	100	95.1	100	26.98	1.44	3.55		
11	15	80						1.0	100	97.6	98.9	100	26.13				
12	15	80							100	100	99.0	100	24.88	0.88	3.10		
13	15	80				0.1			100	100	100	100	25.58				
14	15	80				0.5			100	100	100	100	26.16	1.43	1.99		
15	15	80				1.0			99.4	100	100	100	24.96				
16	15	80					0.1		100	100	100	100	28.10				
17	15	80					1.0		100	100	100	100	24.74				

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл								Гомогени- ость DLS, % (по интенсив- ности)	Гомогенность DLS после стрессов, %			Суммарное изменение кислотнo-щелочного профиля по модулю**, %		
	анти- оксидант	глицерин	метилпара- бензол	полисорбат 80	полисорбат 20	полюксамер 188	артинин	7/х		термо- стресс, 50°C, 120 ч	Шейк- тест 120 ч	заморозка -18°C, разморозка +25°C	термо- стресс, +50°C 120 ч	Шейк- тест 120 ч	заморозка -18°C, разморозка +25°C
18	15	80				0.1	0.1	0.1	100	100	100	100	24.50	2.30	3.68
19	15	80				0.5	0.1	0.1	100	100	100	100	24.55		
20	15	80				1.0	0.1	0.1	100	100	90.0	100	24.64		
21	15	26.5							100	100	100	100	26.79	1.03	1.20
22	15	26.5		0.1					100	100	100	100	24.60		
23	15	26.5		0.5					100	100	100	100	21.96	1.85	2.49
24	15	26.5		1.0					100	100	95.8	100	22.20		
25	15	26.5			0.1				100	100	100	100	24.22		
26	15	26.5			1.0				100	98.5	100	100	26.07		
27	15	26.5				0.1	0.1	0.1	100	100	100	100	22.38		
28	15	26.5				0.5	0.5	0.5	100	100	100	100	21.70	2.74	4.67
29	15	26.5				1.0	1.0	1.0	100	100	100	100	21.16		
30	15	8.0	7.5						100	100	100	100	24.87	2.90	2.91
31	15	8.0	7.5	0.1					100	100	100	100	29.76		
32	15	8.0	7.5	0.5					100	100	100	100	31.09	2.78	0.18
33	15	8.0	7.5	1.0					100	100	100	100	29.96		
34	15	8.0	7.5		0.1				100	100	100	100	27.30		
35	15	8.0	7.5		1.0				100	100	100	100	32.39		
36	15	8.0	7.5			0.1	0.1	0.1	100	100	100	100	31.69		
37	15	8.0	7.5			0.5	0.5	0.5	100	100	100	100	29.55	2.49	0.49
38	15	8.0	7.5			1.0	1.0	1.0	100	100	100	100	30.00		
39	15	26.5		1.5					100	100	100	100	28.52	1.44	1.62
40	15	26.5		1.5	0.1				100	100	100	100	28.41	1.09	0.79
41	15	26.5		1.5	0.5				100	100	100	100	28.16		

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл								Гомогени- ость DLS, % (по интенсив- ности)	Гомогенность DLS после стрессов, %				Суммарное изменение кислотно-щелочного профиля по модулю**, %		
	Anti- φНО ₂	Треталон [®] p/7	L-Пролон	Липидин	Метилонин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксмер 188		Термо- стресс, 50°C, 120 ч	Шейк- тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	Термо- стресс, +50°C 120 ч	Шейк- тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	
42	15		26.5		1.5	1.0			100	100	94.6	100	28.56			
43	15		26.5		1.5		0.1		100	100	92.0	100	33.88			
44	15		26.5		1.5		1.0		100	100	88.4	100	30.46			
45	15		26.5		1.5			0.1	100	100	95.4	100	26.82			
46	15		26.5		1.5			0.5	100	100	92.7	100	24.57	0.33	0.81	
47	15		26.5		1.5			1.0	100	100	100	100	28.22			
48	15	40	13.5						100	100	90.7	100	26.85	1.74	0.77	
49	15	53.3	9.0						100	100	100	100	26.58	1.33	4.37	
50	15	26.7	18						100	100	99.9	100	26.73	0.42	5.87	

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$ ** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле $\Delta = \{ \text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса} \} + \{ \text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса} \} + \{ \text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса} \}$

положительные результаты отрицательные результаты / исходные данные

4.4. Выводы по примеру 4.

В результате исследования показано, что адалимумаб в составе Хумира 1 является наиболее термолабильным из всех исследуемых образцов. Термостресс 50°C в течение 120 часов приводит к максимальному приросту примесей (1.2 %) на Э ВЭЖХ, а также к максимальному изменению кислотно-щелочного профиля (суммарное абсолютное изменение всех фракций более 33% на приборе LabChip Caliper). Коллоидная стабильность образца в составе Хумира 1 сравнима с альтернативными составами.

Состав Хумира 2 обладает сравнимой с альтернативными составами термической стабильностью (потеря чистоты в ходе термостресса 0.38 %). Однако при заморозке-разморозке адалимумаба в данном составе происходит заметная агрегация белка: прирост агрегатов на эксклюзионной ВЭЖХ составляет более 7%, что делает непригодным применение препарата при его случайном замерзании. Заметный прирост примесей после заморозки также отмечен с помощью DLS.

Альтернативные составы на основе ацетатного буферного раствора с добавлением ряда вспомогательных веществ проявили хорошую термическую и коллоидную стабильность в ходе стрессов. Эксклюзионная ВЭЖХ не выявила разницы в приросте примесей данных составов. Также не выявлено значимого влияния поверхностно-активных веществ на стабильность адалимумаба в концентрации 15 мг/мл.

Анализ стрессированных образцов с помощью DLS показал, что присутствие в составе аргинина гидрохлорида снижает прирост примесей в ходе шейк-теста, а присутствие метионина повышает накопление примесей при шейкировании.

Минимальное изменение кислотно-щелочного профиля отмечено для составов 12 – 29 (составы, содержащие трегалозу и аргинина гидрохлорид, а также содержащие L-пролин). На основании результатов настоящего исследования перспективными составами для адалимумаба являются:

Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0–6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0–6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл Полисорбат 20 / Полисорбат 80 / Полоксамер 188 0.5 – 1.0 мг/мл
Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0–6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл Аргинина гидрохлорид 0.1 мг/мл	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0–6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл Аргинина гидрохлорид 0.1 мг/мл Полисорбат 20 / Полисорбат 80 / Полоксамер 188 0.5 – 1.0 мг/мл
Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0–6.0 L-Пролин 27 мг/мл	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0–6.0 L-Пролин 27 мг/мл Полисорбат 20 / Полисорбат 80 / Полоксамер 188 0.5 – 1.0 мг/мл

Пример 5. Подтверждение финальной фармацевтической композиции высококонцентрированного адалимумаба.

Для подтверждения стабильности рекомендуемых фармацевтических композиций адалимумаб в концентрации 50 мг/мл, 100 мг/мл и 150 мг/мл был подвергнут термострессу при 50°C в течение 6 суток.

Исследуемые составы.

№	Буферный раствор	Конц. белка	Трегалозы д/г	L-Пролин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксамер 188	Аргинина г/х
1	Ацетатный буферный раствор, рН 5.0-6.0	50	Состав Хумира 1 (см. п. 1)					
2			Состав Хумира 2 (см. п. 1)					
3			80		0.5			0.1
4			80		1.0			0.1
5			80			0.5		0.1
6			80			1.0		0.1
7			80				0.5	0.1
8			80				1.0	0.1
9			80		0.5		0.5	0.1
10				27	0.5			
11				27	1.0			
12				27		0.5		
13				27		1.0		
14				27			0.5	
15				27			1.0	
16				27	0.5		0.5	
17		100	Состав Хумира 1 (см. п. 1)					
18			Состав Хумира 2 (см. п. 1)					
19			80		0.5			0.1
20			80		1.0			0.1
21			80			0.5		0.1
22			80			1.0		0.1
23			80				0.5	0.1
24			80				1.0	0.1
25			80		0.5		0.5	0.1
26				27	0.5			
27				27	1.0			
28				27		0.5		
29				27		1.0		
30				27			0.5	
31				27			1.0	
32				27	0.5		0.5	

№	Буферный раствор	Конц. белка	Трегалозы д/г	L-Пролин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полосамер 188	Аргинина г/х
33	Ацетатный буферный раствор, рН 5.0–6.0	150	Состав Хумира 1 (см. п. 1)					
34			Состав Хумира 2 (см. п. 1)					
35			80		0.5			0.1
37			80		1.0			0.1
38			80			0.5		0.1
39			80			1.0		0.1
40			80				0.5	0.1
41			80				1.0	0.1
42			80		0.5		0.5	0.1
43				27	0.5			
44				27	1.0			
45				27		0.5		
46				27		1.0		
47				27			0.5	
48				27			1.0	
49				27	0.5		0.5	

5.1. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

5.2. Результаты.

Таблица 10. Сводные результаты концентрированных образцов с pH 5.0 до и после стрессов.

#	Состав							Э ВЭХ		ИЭ ВЭХ				ПААГ электрофорез				Спец. активность	
	Конц. белка	Третичная структура	L-пролин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полисорбат 188	Аргининная п/к	Содержание мономера, %	Изменение чистоты после стресса, 50°C, 144 ч *	Содержание фракций, %			Суммарное изменение кислотности-основности по профилю по мольным % *	Содержание мономера, %		Изменение чистоты после стресса, 50°C, 144 ч *		Активность по стрессу	Спец. активность
										кисл	осн.	щел		Ред.	Перед.	Ред.	Перед.		
1								99.85	2.67	11.30	86.90	1.80	61.87	98.46	94.64	-1.68	-6.48	96	92
2								99.85	1.65	11.19	87.16	1.66	61.66	98.73	94.89	-1.46	-3.48	97	95
3				0.5			0.1	99.30	1.55	11.48	86.88	1.65	64.49			-1.46	-2.59		92
4				1.0			0.1	99.04	1.62	9.59	88.92	1.49	68.05			-0.99	-1.46		93
5					0.5		0.1	99.38	1.79	11.46	86.85	1.69	62.11			-1.41	-3.19		91
6					1.0		0.1	99.34	1.72	11.89	86.80	1.31	63.01	97.99	94.16	-1.37	-3.49	94	90
7						0.5	0.1	99.48	1.54	11.02	87.38	1.60	63.66			-1.31	-3.10		91
8	50					1.0	0.1	99.45	1.62	11.02	87.58	1.40	64.68			-1.67	-3.79		91
9				0.5			0.1	99.35	1.66	11.09	86.97	1.94	63.79			-1.78	-3.91		90
10			27	0.5				99.29	1.76	11.27	87.19	1.55	62.47			-1.46	-3.49		97
11			27	1.0				99.93	1.81	11.43	87.03	1.54	62.11			-1.78	-2.41		96
12			27		0.5			99.44	1.69	11.41	87.18	1.41	62.46			-1.41	-2.46		94
13			27		1.0			99.65	1.79	11.98	86.53	1.49	62.41	98.10	94.78	-1.29	-3.01	96	93
14			27			0.5		99.41	1.72	11.95	86.42	1.63	60.36			-1.29	-2.64		94
15			27			1.0		99.22	1.58	11.40	87.15	1.44	62.77			-1.38	-2.04		95
16			27	0.5				99.03	1.79	11.46	87.00	1.54	64.66			-1.43	-3.14		93

№	Состав							Э ВЭХ		ИД ВЭХ				ПААГ электрофорез				Спец. активность		
	Конц. белка	Трипановая А/Т	L-пролин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Поноксамер 188	Адипитинина г/х	Содержание мономера, *	Изменение чистоты после термостресса, 50°С, 144 ч *	Содержание фракций, *			Суммарное изменение кислотно-щелочного профиля по моль/мг **, *	Содержание мономера, %		Изменение чистоты после термостресса, 50°С, 144 ч *	Активность по стрессу	Значение после термостресса, 50°С, 144 ч		
										кисл.	осн.	щел		Ред.	Перед.					
17					Состав Хулида 1 (см. п. 1)			99.75	2.99	11.63	86.41	1.96	60.84	60.84	97.95	94.10	-1.46	-7.23	98	99
18					Состав Хулида 2 (см. п. 1)			99.84	2.26	11.20	87.10	1.70	61.30	61.30	98.26	94.74	-1.68	-3.15	99	75
19					80		0.1	99.26	2.01	10.63	87.77	1.60	64.94	64.94			-1.54	-2.86		91
20					80		0.1	99.90	2.48	9.55	89.06	1.40	69.09	69.09			-1.82	-4.52		84
21					80		0.1	99.30	2.06	11.46	87.04	1.50	65.03	65.03			-2.06	-4.61		89
22					80		0.1	99.10	2.09	11.98	86.39	1.63	65.87	65.87	98.38	94.11	-2.21	-4.13	98	84
23					80		0.1	99.38	2.01	11.15	87.25	1.61	63.18	63.18			-2.27	-4.06		81
24	100				80		0.1	99.29	2.36	10.85	87.57	1.58	65.63	65.63			-2.57	-4.20		86
25					80		0.1	99.41	2.46	11.86	86.98	1.16	63.64	63.64			-2.66	-4.49		88
26					27	0.5		99.08	2.21	11.21	87.31	1.48	62.43	62.43			-3.09	-4.25		91
27					27	1.0		99.95	1.87	10.62	87.82	1.57	60.90	60.90			-2.68	-3.44		87
28							0.5	99.43	2.62	11.41	86.93	1.66	64.13	64.13			-2.64	-3.46		89
29							1.0	99.46	2.49	11.32	86.90	1.78	63.89	63.89	98.35	94.09	-1.89	-3.49	97	88
30							0.5	99.28	2.48	10.99	87.31	1.71	62.47	62.47			-1.44	-3.09		89
31							1.0	99.33	1.92	11.52	87.08	1.40	60.28	60.28			-0.84	-2.09		89
32					27	0.5		99.38	2.31	10.46	87.79	1.75	62.48	62.48			-1.98	-3.01		86

№	Состав							Э ВЭХ		ИД ВЭХ			ПААГ электрофорез				Спец. активность			
	Конц. белка	Триглицериды Д/Л	L-Липиды	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Поноксамер 188	Адипиниона Г/Х	Содержание мономера, %	Изменение чистоты после термостресса, 50°С, 144 ч *	Содержание фракций, %			Суммарное изменение кислотного-щелочного профиля по модулю **, *	Содержание мономера, %		Изменение чистоты после термостресса, 50°С, 144 ч*	Активность до стресса	Активность после стресса		
										кисл.	осн.	щел.		Ред.	Неред.				Ред.	Неред.
33	150	Состав Хумира 1 (см. п. 1)						99,88	3,22	11,45	86,73	1,82	59,91	98,29	94,64	-1,92	-6,61	99	98	Значение после термостресса, 50°С, 144 ч
34		Состав Хумира 2 (см. п. 1)						99,72	2,81	11,19	87,16	1,65	60,64	98,43	94,06	-1,75	-7,52	99	101	
35		80	0,5				0,1	99,09	2,40	10,75	87,64	1,61	63,48			-1,82	-4,13		113	
37		80		1,0			0,1	99,92	2,67	11,28	87,01	1,71	62,90			-2,00	-6,09		98	
38		80			0,5		0,1	99,24	2,45	11,28	87,25	1,47	62,30			-2,28	-4,34		99	
39		80				1,0	0,1	99,16	2,80	10,73	87,75	1,52	64,32	98,32	94,85	-2,70	-4,24	98	97	
40		80					0,1	99,74	2,89	11,39	86,92	1,69	64,11			-2,20	-4,11		94	
41		80					0,1	99,12	2,80	11,74	86,80	1,46	63,79			-2,67	-4,06		93	
42		80		0,5			0,1	99,20	2,79	11,79	86,52	1,69	64,39			-2,78	-4,08		96	
43			27	0,5					99,88	2,48	11,28	87,10	1,63	62,63			-3,13	-2,37		
44		27	1,0					99,61	2,64	11,35	87,07	1,58	61,45			-2,92	-2,50		88	
45		27			0,5			99,46	2,71	11,49	86,78	1,73	63,44			-2,01	-2,03		89	
46		27			1,0			99,42	2,83	11,13	86,99	1,88	63,79	98,45	94,14	-2,03	-1,95	97	87	
47		27				0,5		99,12	2,36	10,91	87,27	1,82	62,17			-1,45	0,92		86	
48		27				1,0		99,12	2,52	11,30	87,14	1,57	61,01			-2,08	-1,73		92	
49		27	0,5			0,5		99,42	2,80	11,98	86,56	1,46	61,09			-2,35	-1,79		91	

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$ ** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле $\Delta = |\text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса}| + |\text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса}| + |\text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса}|$

положительные результаты отрицательные результаты средние результаты / исходные данные

Таблица 11. Сводные результаты концентрированных образцов с pH 6.0 до и после стрессов.

№	Состав						Э ВЭЖ		ИО ВЭЖ			ПААГ электрофорез				Активность по стрессу	Спец. активность		
	Конц. белка	Третичное R/T	L-Протин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полисорбат 128	Аргинина г/г	Содержание мономера, %	Изменение чистоты после стресса, 50°С 144 ч *	Содержание фракций, %			Суммарное количество аминокислотно-желочного профиля по моль/мг**	Содержание мономера, %				Изменение чистоты после стресса, 50°С, 144 ч*	
										кисл.	осн.	жел.		Ред.	Перед				
1	50	80	Состав Хумира 1 (см. п. 1)					99.85	2.67	11.30	86.90	1.80	61.87	98.46	94.64	-1.68	-6.46	96	92
2		80	Состав Хумира 2 (см. п. 1)					99.85	1.65	11.13	87.16	1.66	61.66	98.73	94.89	-1.46	-3.48	97	95
50		80		0.5				99.31	1.66	11.38	86.47	2.15	61.44			-1.66	-2.41		92
51		80		1.0				99.41	1.74	11.46	86.99	1.53	62.01			-1.45	-3.08		88
52		80			0.5			99.64	1.61	11.84	87.01	1.15	64.21			-1.11	-2.49		94
53		80			1.0			99.41	1.45	11.35	86.86	1.79	64.26	97.66	94.06	-1.65	-2.77	94	96
54		80				0.5		99.29	1.56	11.65	86.88	1.47	61.87			-1.82	-2.09		89
55		80				1.0		99.56	1.59	11.98	86.79	1.23	61.94			-1.97	-2.67		91
56		80		0.5		0.5		99.16	1.67	11.71	87.16	1.13	61.81			-1.19	-2.48		96
57			27	0.5				99.64	1.47	11.22	87.19	1.59	60.20			-0.80	-2.37		95
58			27	1.0				99.67	1.88	11.64	86.68	1.88	62.11			-0.91	-2.48		94
59			27		0.5			99.73	1.62	11.58	86.63	1.79	63.53			-1.19	-2.61		89
60			27		1.0			99.48	1.40	11.27	87.15	1.58	60.84	98.02	94.41	-1.41	-2.00	95	96
61			27				0.5	99.35	1.89	11.34	86.81	1.85	60.84			-1.06	-3.09		91
62			27				1.0	99.47	1.85	11.65	87.09	1.26	61.01			-0.94	-2.14		90
63			27	0.5			0.5	99.58	1.74	11.82	87.14	1.04	60.06			-1.23	-2.90		93

Состав							Э ВЭЖХ		ИД ВЭЖХ				ПААГ электрофорез				Спец. активность		
#	Конц. белка	Гепарановый э/г	L-Пронин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксаметр	Аргинина г/г	Изменение чистоты после термостресса, 50°С, 144 ч*		Содержание фракций, %		Суммарное изменение кислотно-щелочного профиля по мольным*		Содержание мономера, %		Изменение чистоты после термостресса, 50°С, 144 ч*		Активность по стрессу	Значение после термостресса, 50°С, 144 ч
								Содержание мономера, %	Изменение чистоты после термостресса, 50°С, 144 ч*	кисл.	осн.	жел.	Ред.	Нерад.	Ред.	Нерад.			
17				Состав Хумира 1 (см. п. 1)				99.75	2.99	11.63	86.41	1.96	60.84	97.95	94.13	-1.46	-7.23	98	99
18				Состав Хумира 2 (см. п. 1)				99.84	2.26	11.20	87.10	1.70	61.30	98.26	94.74	-1.68	-3.15	99	75
64				80	0.5		0.1	99.31	2.34	11.55	86.65	1.80	69.84			-1.35	-2.06		94
65				80	1.0		0.1	99.26	2.41	11.64	86.84	1.52	66.44			-1.82	-3.49		96
66				80		0.5	0.1	99.64	2.43	11.20	86.69	2.11	62.59			-2.31	-4.11		89
67				80		1.0	0.1	99.53	1.99	11.68	86.72	1.60	61.49	98.12	94.66	-2.48	-3.69	98	90
68				80			0.1	99.16	1.04	11.54	86.69	1.77	61.48			-2.64	-3.17		91
69	100			80			0.1	99.60	1.91	11.20	86.51	2.29	62.03			-2.41	-3.76		92
70				80	0.5		0.1	99.22	2.06	11.28	87.12	1.60	62.07			-2.37	-3.19		93
71			27	0.5				99.18	2.24	11.62	87.30	1.08	61.34			-3.11	-2.22		94
72			27	1.0				99.67	2.16	11.59	86.88	1.53	61.55			-2.46	-3.49		96
73			27		0.5			99.48	2.19	11.41	86.84	1.75	60.48			-2.80	-3.85		88
74			27		1.0			99.49	1.99	11.60	86.70	1.70	60.68	98.32	94.21	-1.42	-3.41	102	89
75			27					99.56	2.09	11.26	86.90	1.84	61.89			0.84	-2.18		90
76			27					99.62	2.22	11.41	86.66	1.93	60.76			0.98	-2.14		93
77			27	0.5				99.44	2.37	11.73	86.58	1.69	63.18			-1.49	-3.11		98

Состав							Э ВЭЖ		ИО ВЭЖ			ПААГ электрофорез			Спец. активность					
№	Конц. белка	Третичная Д/Т	Л-Протеин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Поноксамер 188	Аргинина г/х	Содержание мономера, %	Изменение чистоты после термостресса, 50 °C 144 ч*	Содержание фракций, %			Суммарное изменение кислотно-щелочного профиля **, *		Содержание мономера, %		Изменение чистоты после термостресса, 50 °C, 144 ч*	Активность до стресса	Спец. активность после термостресса, 50 °C, 144 ч	
										кисл	осн.	щел	кислотно-щелочного	мономер**	мономер*	Ред.				Неред.
33	150	Состав Хумира 1 (см. п. 1)						99.88	3.22	11.45	86.73	1.82	59.91	98.29	94.64	-1.92	-6.61	99	98	
34		Состав Хумира 2 (см. п. 1)						99.72	2.81	11.19	87.16	1.65	60.64	98.43	94.06	-1.75	-7.52	99	101	
78		80		0.5				0.1	99.18	2.87	11.44	86.88	1.68	59.22			-0.82	-4.41		94
79		80		1.0				0.1	99.25	2.66	11.52	86.57	1.91	60.16			-2.08	-4.09		92
80		80			0.5			0.1	99.35	2.28	11.68	86.69	1.63	63.11			-2.14	-4.44		92
81		80				1.0		0.1	99.41	1.87	11.97	86.81	1.22	62.59	98.13	94.54	-2.62	-4.14	99	93
82		80					0.5	0.1	99.64	2.44	11.44	86.76	1.80	63.00			-2.33	-4.16		93
83		80					1.0	0.1	99.12	2.57	11.50	86.58	1.92	62.41			-2.57	-4.90		94
84		80			0.5			0.1	99.16	2.14	11.64	86.59	1.77	63.49			-2.60	-4.16		91
85				27	0.5				99.26	5.49	11.63	86.74	1.63	61.18			-2.13	-3.37		94
86			27	1.0				99.61	1.88	11.80	86.59	1.61	60.66			-1.87	-2.11		96	
87			27		0.5			99.34	2.91	11.68	86.44	1.88	60.49			-2.06	-2.18		92	
88			27		1.0			99.55	2.60	11.91	86.58	1.51	61.27	98.04	94.10	-2.74	-2.95	97	88	
89			27					99.16	2.58	11.11	86.93	1.96	61.08			-1.73	-1.99		89	
90			27			1.0		99.20	2.78	11.54	86.97	1.49	62.54			-2.13	-2.60		90	
91			27	0.5		0.5		99.44	2.43	11.67	86.77	1.56	60.20			-2.01	-2.06		93	

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$ ** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле $\Delta = |\text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса}| + |\text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса}| + |\text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса}|$

положительные результаты отрицательные результаты средние результаты / исходные данные

Общие выводы

1. Скрининг стабильной фармацевтической композиции адалимумаба был выполнен в несколько этапов: выбор природы буферного раствора, выбор pH и буферной емкости раствора, выбор осмолитиков и стабилизаторов, выбор финальной фармацевтической композиции и подтверждение финальной фармацевтической композиции высококонцентрированного адалимумаба.

2. В процессе работы изучены термическая и коллоидная стабильность адалимумаба в более, чем 90 составах, с использованием методов: ПЭГ-агрегация, шейк-тест, заморозка-разморозка, термостресс с последующим анализом степени мутности (УФ-спектрофотометрия), чистоты (эксклюзионная ВЭЖХ, динамическое светорассеяние и гель-электрофорез, в том числе с помощью системы LabChip, Caliper), а также кислотно-щелочного профиля (LabChip, Caliper и ионообменная ВЭЖХ).

3. В результате исследования выявлена низкая термическая стабильность оригинального состава препарата Хумира (Хумира 1), используемого в коммерческом препарате с концентрацией адалимумаба 50 мг/мл, по сравнению с составами настоящего изобретения.

4. В ходе эксперимента выявлено значимое влияние процессов замораживания и оттаивания на агрегацию адалимумаба в оригинальном составе препарата Хумира (Хумира 2), используемом в коммерческом препарате адалимумаба 100 мг/мл, по сравнению с составами настоящего изобретения.

5. Фармацевтические композиции адалимумаба на основе ацетатного буферного раствора с pH 5.0 – 6.0 с добавлением трегалозы дигидрата, аргинина гидрохлорида, пролина, а также поверхностно-активных веществ из группы полисорбата 20, полисорбата 80 и полуксамера 188 проявляют большую термическую и коллоидную стабильность в концентрациях 50 – 150 мг/мл по сравнению оригинальными составами и являются предметом настоящего изобретения.

Оптимальный состав вспомогательных веществ адалимумаба выбран для растворов с pH 5.5. Стабильность адалимумаба в составах с диапазоном pH 5.0 – 6.0 подтверждена на образцах в концентрациях белка 50, 100 и 150 мг/мл.

6. В ходе технологического процесса при получении фармацевтических композиций настоящего изобретения с концентрацией адалимумаба 150 мг/мл концентрирование возможно до 200 мг/мл без потери качества белка для последующего разведения при внесении ПАВ, а также при промывке ультрафильтрационной установки после концентрирования.

Формула изобретения

- 1 Водная фармацевтическая композиция для внутривенного или подкожного введения, содержащая:
 - a) рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α ;
 - b) буферный агент (или буферную систему) на основе ацетат-ионов;
 - c) трегалозу и/или пролин или трегалозу и аргинин;
 - d) полисорбат 20, полисорбат 80 или полуксамер 188 или их комбинацию.
- 2 Композиция по п.1, где рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.
- 3 Композиция по пп.1-2, где концентрация моноклонального антитела составляет от 50 до 200 мг/мл.
- 4 Композиция по п. 1 где концентрация ацетатного буферного раствора составляет от 1 до 100 мМ.
- 5 Композиция по п. 1, где композиция имеет pH от 4 до 7.
- 6 Композиция по п. 1, где концентрация трегалозы составляет от 25 до 150 мг/мл.
- 7 Композиция по п. 1, где концентрация пролина составляет от 5 до 40 мг/мл.
- 8 Композиция по п. 1, где концентрация трегалозы составляет от 25 до 150 мг/мл, а концентрация аргинина составляет от 0.05 до 0.5 мг/мл.
- 9 Композиция по п. 1, где концентрация полисорбата 20 составляет от 0.05 мг/мл до 10 мг/мл.
- 10 Композиция по п. 1, где концентрация полисорбата 80 составляет от 0.05 мг/мл до 10 мг/мл.
- 11 Композиция по п. 1, где концентрация полуксамера 188 составляет от 0.05 мг/мл до 10 мг/мл.
- 12 Композиция по п. 1, содержащая:
 - a) от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α ;
 - b) от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина, или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.0 – 6.0;

- е) от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полисорбата 80.

13 Композиция по п.12, где рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.

14 Композиция по п. 12, содержащая:

- а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
- б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
- с) 80 мг/мл трегалозы дигидрата;
- д) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
- е) 0.5 мг/мл полисорбата 80.

15 Композиция по п. 12, содержащая:

- а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
- б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
- с) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида;
- д) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
- е) 0.5 мг/мл полисорбата 80.

16 Композиция по п. 12, содержащая:

- а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
- б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
- с) 27 мг/мл пролина;
- д) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
- е) 0.5 мг/мл полисорбата 80.

17 Композиция по п. 12, содержащая:

- а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
- б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
- с) 40 мг/мл трегалозы дигидрата;
- д) 13.5 мг/мл пролина;
- е) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
- ф) 0.5 мг/мл полисорбата 80.

18 Композиция по п. 1, содержащая:

- а) от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α ;
- б) от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
- с) от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина, или
от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0,05 до 0.5 мг/мл аргинина
- д) уксусную кислоту лед. до pH 5.0 – 6.0;
- е) от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полисорбата 20.

19 Композиция по п.18, где рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.

20 Композиция по п. 18, содержащая:

- а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
- б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;

- c) 80 мг/мл трегалозы дигидрата;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - e) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
- 21 Композиция по п. 18, содержащая:
- a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - e) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
- 22 Композиция по п. 18, содержащая:
- a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 27 мг/мл пролина;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - e) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
- 23 Композиция по п. 18, содержащая:
- a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 40 мг/мл трегалозы дигидрата;
 - d) 13.5 мг/мл пролина;
 - e) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - f) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
- 24 Композиция по п. 1, содержащая:
- a) от 50 до 200 мг/мл рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α ;
 - b) от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или 5 до 40 мг/мл пролина, или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.0 – 6.0;
 - e) от 0.1 мг/мл до 1 мг/мл полоксамера 188.
- 25 Композиция по п.24, где рекомбинантное моноклональное антитело к ФНО α представляет собой адалимумаб.
- 26 Композиция по п. 24, содержащая:
- a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 80 мг/мл трегалозы дигидрата;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - e) 1.0 мг/мл полоксамера 188.
- 27 Композиция по п. 24, содержащая:
- a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;

- с) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида;
- д) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
- е) 1.0 мг/мл полоксамера 188.

28 Композиция по п. 24, содержащая:

- а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
- б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
- с) 27 мг/мл пролина;
- д) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
- е) 1.0 мг/мл полоксамера 188.

29 Композиция по п. 24, содержащая:

- а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
- б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
- с) 40 мг/мл трегалозы дигидрата;
- д) 13.5 мг/мл пролина;
- е) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
- ф) 1.0 мг/мл полоксамера 188.

30 Способ лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающий введения композиции по пп. 1-29 в эффективном количестве.

31 31. Способ по п.30 где заболевание, опосредованное ФНО α , выбирают из группы:

- а) активный ревматоидный артрит (среднетяжелый и тяжелый степени),
- б) активный псориатический артрит,
- с) активный анкилозирующий спондилит,
- д) хронический бляшечный псориаз (среднетяжелой или тяжелой степени),
- е) язвенный колит (среднетяжелой и тяжелой степени),
- ф) аксиальный спондилоартрит,
- г) активный гнойный гидраденит,
- х) ювенильный идиопатический артрит,
- и) болезнь Крона (среднетяжелой или тяжелой степени),
- j) увеит,
- к) активный энтезит-ассоциированный артрит.

32 Применение композиции по пп. 1-29 для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α .

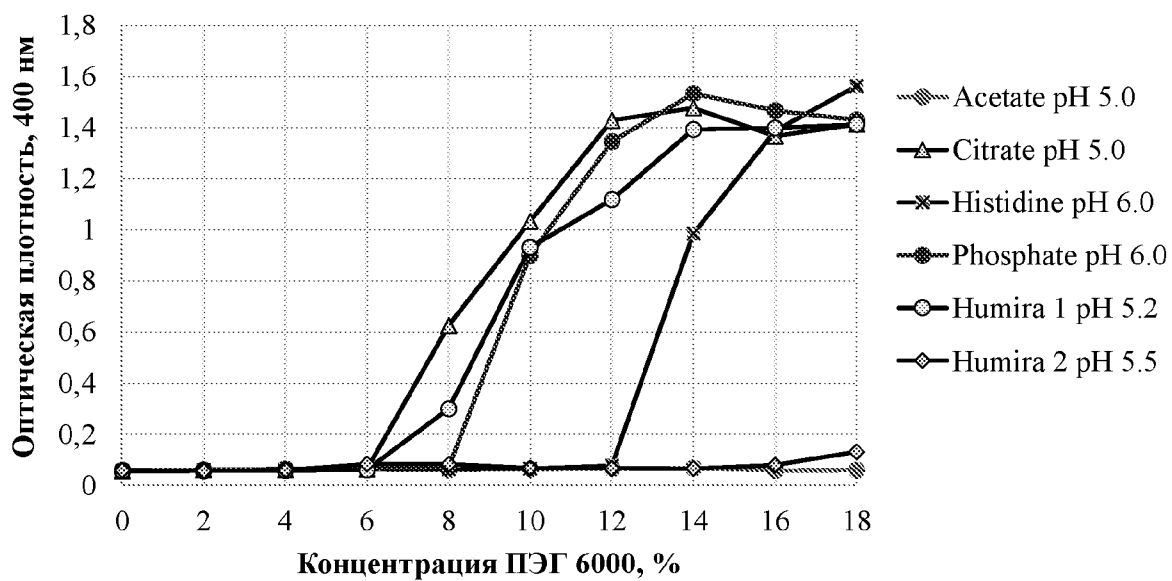
33 Применение по п. 32, где заболевание выбирают из группы:

- а) активный ревматоидный артрит (среднетяжелый и тяжелый степени),
- б) активный псориатический артрит,
- с) активный анкилозирующий спондилит,
- д) хронический бляшечный псориаз (среднетяжелой или тяжелой степени),
- е) язвенный колит (среднетяжелой и тяжелой степени),
- ф) аксиальный спондилоартрит,

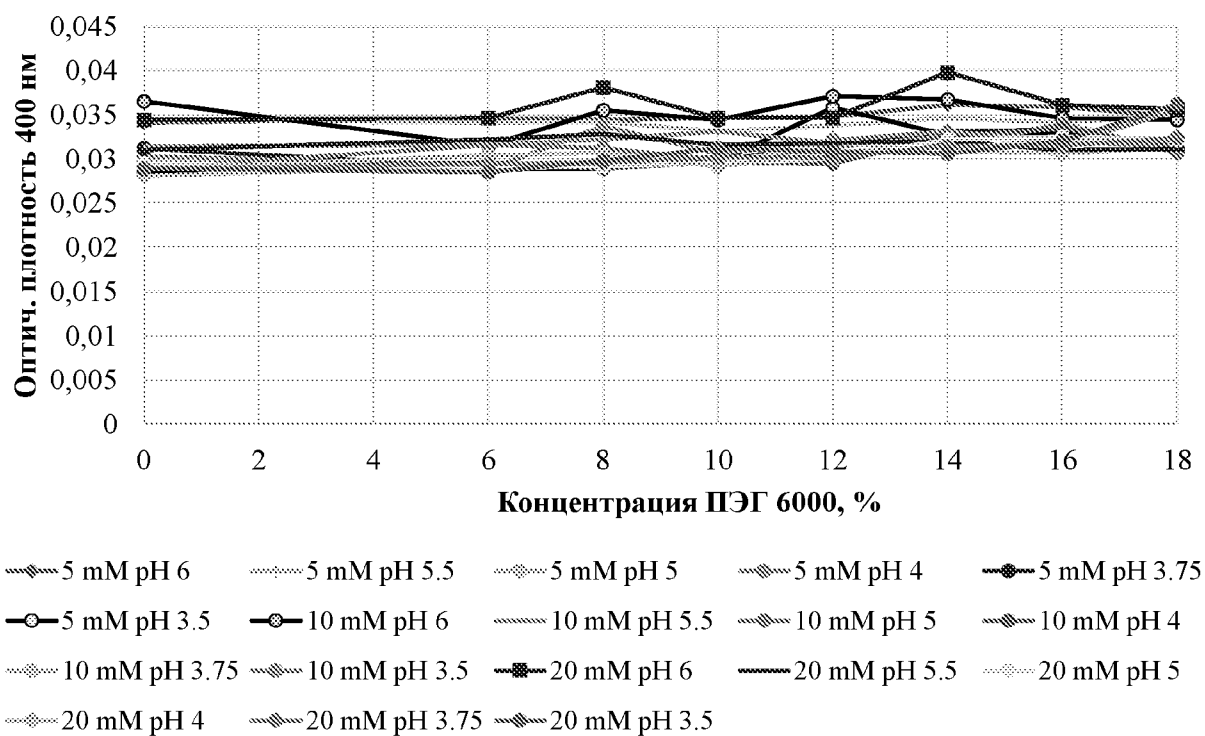
- g) активный гнойный гидраденит,
- h) ювенильный идиопатический артрит,
- i) болезнь Крона (среднетяжёлой или тяжёлой степени),
- j) увеит,
- k) активный энтезит-ассоциированный артрит.

34 Способ получения композиции по любому из пп. 1-29, включающий добавление в водную фазу ацетатных буферных агентов, с последующим добавлением, в любой последовательности, следующих компонентов:

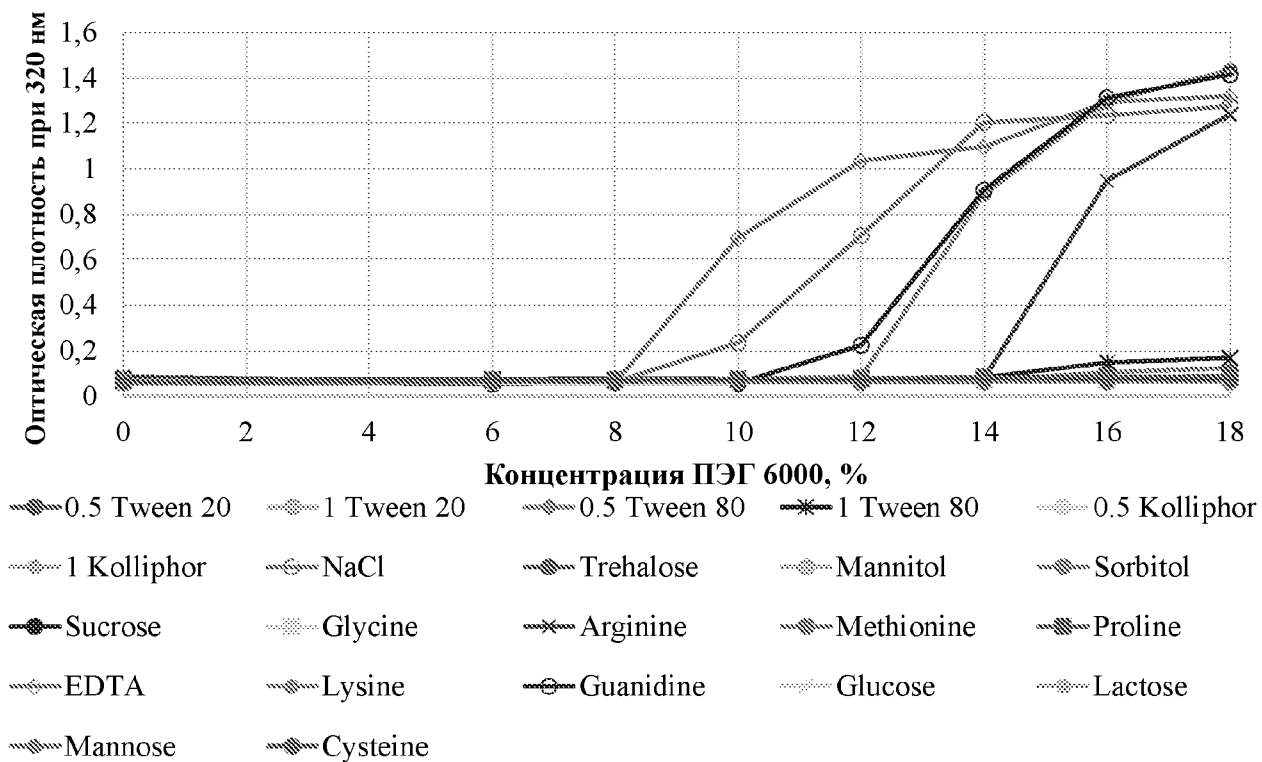
- a) осмолитика и/или стабилизатора, выбранного из группы: трегалозы, пролина, аргинина или их сочетания;
- b) рекомбинантного моноклонального антитела к ФНО α ;
- c) поверхностно-активного вещества, выбранного из группы: полисорбата 20, полисорбата 80, полуксамера 188 или их сочетания.



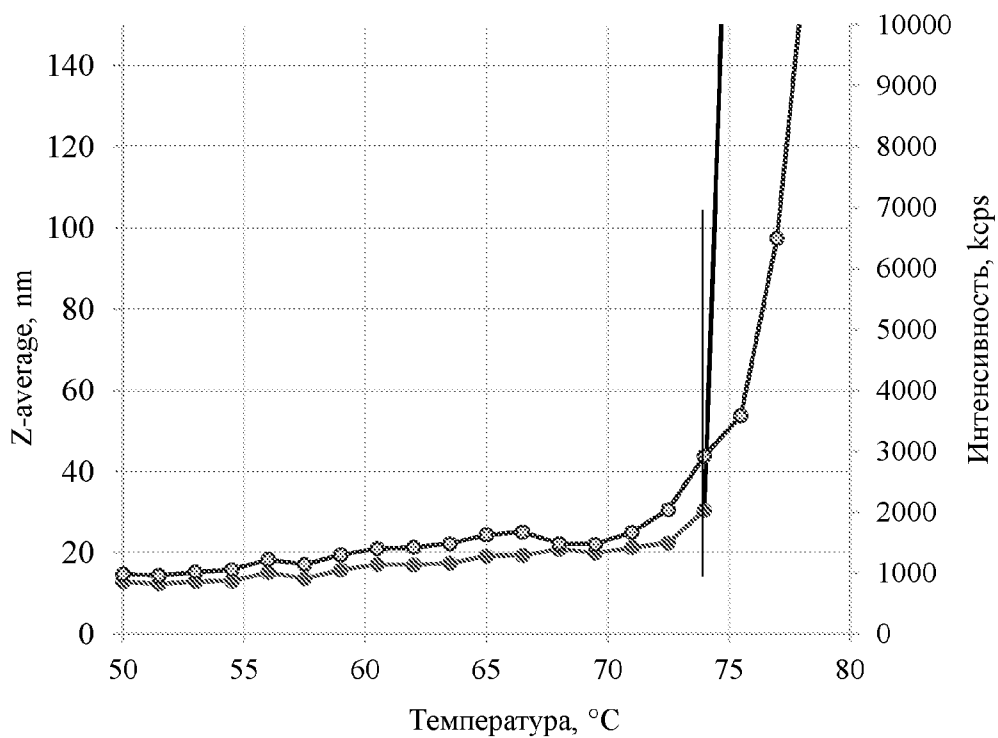
Фиг. 1.



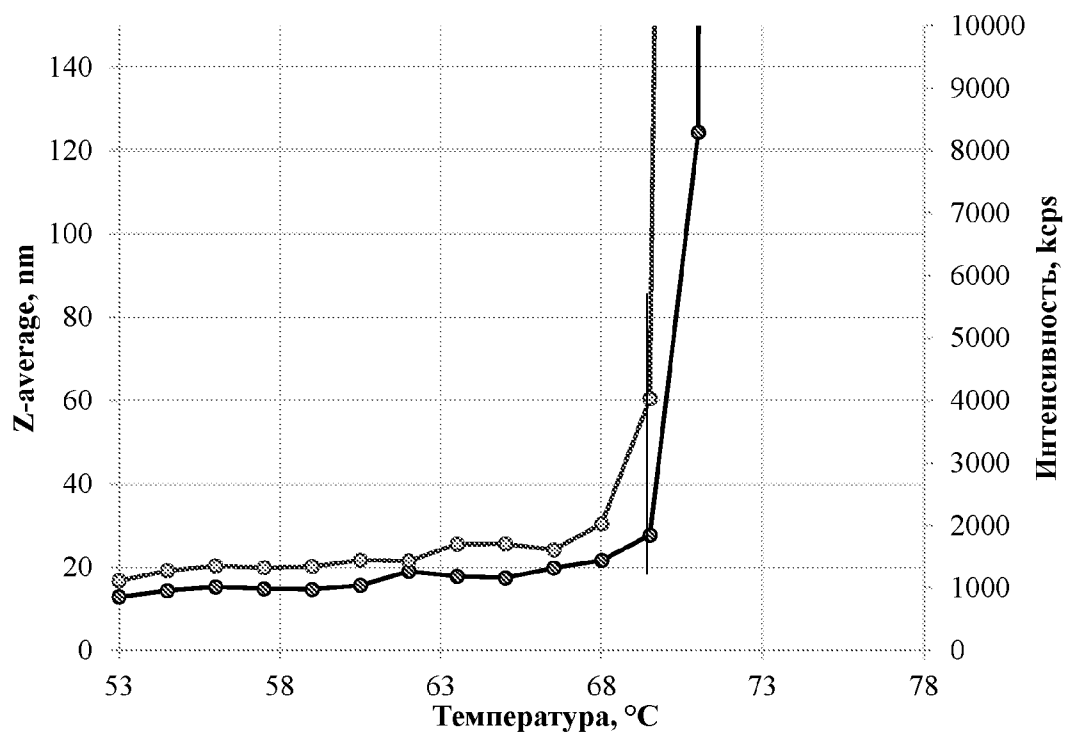
Фиг. 2.



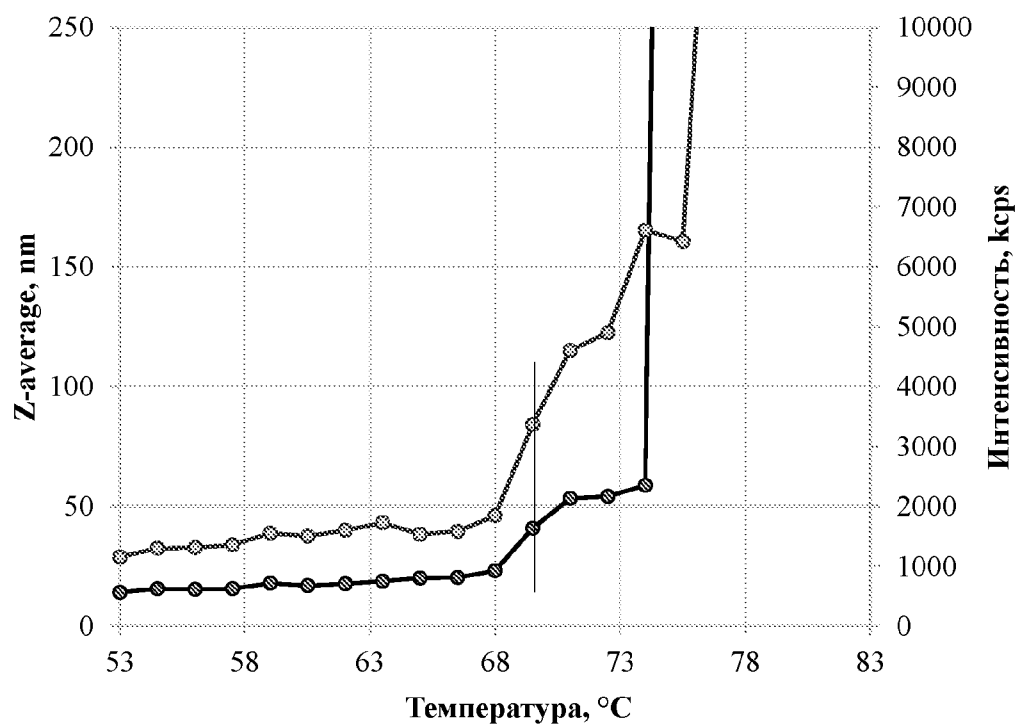
Фиг.3.



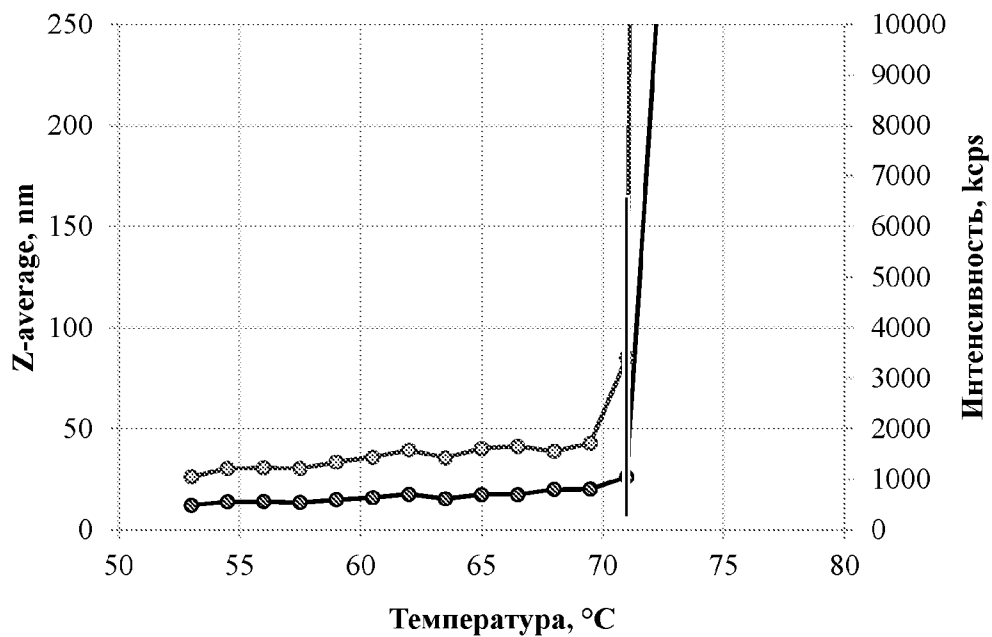
Фиг.4.



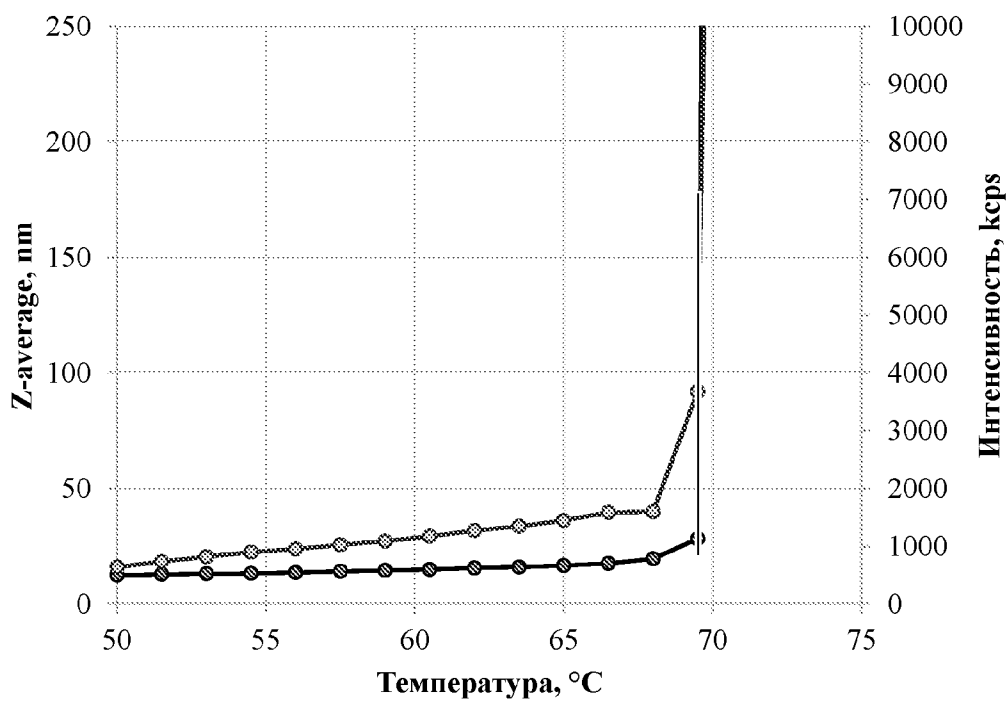
Фиг. 5.



Фиг. 6.



Фиг. 7.



Фиг. 8.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2017/050133

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 39/00, 39/395, A61P 37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch (RUPTO internal), Esp@cenet, PAJ, USPTO, Information Retrieval System of FIPS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/121140 A1 (FACET BIOTECH CORPORATION et al.) 21.10.2010, paragraphs [0010], [0156] - [0168], [0173]	1, 2, 4-11, 30-34 3, 12-29
D, Y	WO 2012/065072 A2 (ABBOTT BIOTECHNOLOGY LTD et al.) 18.05.2012, p. 3, lines 2-5	3, 12-29
Y	DOSON P. et al. Spravochnik biokhimika. Moscow "Mir" 1991, p. 357	3, 12-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

10 April 2018 (10.04.2018)

Date of mailing of the international search report

19 April 2018 (19.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ		Номер международной заявки PCT/RU 2017/050133
A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ <i>A61K 39/395 (2006.01)</i> <i>A61P 37/00 (2006.01)</i> Согласно Международной патентной классификации МПК		
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации) A61K 39/00, 39/395, A61P 37/00		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) PatSearch (RUPTO internal), Esp@cenet, PAJ, USPTO, Information Retrieval System of FIPS		
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X Y	WO 2010/121140 A1 (FACET BIOTECH CORPORATION et al.) 21.10.2010, параграфы [0010], [0156] - [0168], [0173]	1, 2, 4-11, 30-34 3, 12-29
D, Y	WO 2012/065072 A2 (ABBOTT BIOTECHNOLOGY LTD et al.) 18.05.2012, с. 3, строки 2-5	3, 12-29
Y	ДОСОН Р. и др. Справочник биохимика. Москва "Мир" 1991, с. 357	3, 12-29
☐ последующие документы указаны в продолжении графы C. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным "Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее "L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) "O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста "&" документ, являющийся патентом-аналогом	
Дата действительного завершения международного поиска 10 апреля 2018 (10.04.2018)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 19 апреля 2018 (19.04.2018)	
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37	Уполномоченное лицо: В. Сливницына Телефон № (495)531-64-81	