

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992377** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.02.17

(22) Дата подачи заявки
2018.03.23

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **СТАБИЛЬНАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА**

(31) 62/482,270

(32) 2017.04.06

(33) US

(86) PCT/US2018/024032

(87) WO 2018/187057 2018.10.11

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Ху Цинянь, Лю Динцзян (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к стабильным фармацевтическим композициям, содержащим человеческое антитело, которое специфически связывает человеческий белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1). В конкретных вариантах осуществления композиции содержат, помимо анти-PD-1 антитела, буфер, аминокислоту, неионный сурфактант и сахар. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению демонстрируют значительную степень стабильности антитела в условиях стресса и хранения.

201992377
A1

201992377

A1

СТАБИЛЬНАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА

[001] Настоящая заявка подана 23 марта 2018 г. в виде РСТ международной патентной заявки и претендует на приоритет по отношению к предварительной патентной заявке США № 62/482270, поданной 6 апреля 2017 г., полное содержание которой, таким образом, включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[002] Настоящее изобретение относится к области композиций терапевтических антител. Более конкретно, настоящее изобретение относится к области фармацевтических композиций, содержащих человеческое антитело, которое специфически связывает человеческий белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1).

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] Терапевтические макромолекулы (например, антитела) должны быть сформулированы таким образом, чтобы молекулы не только подходили для введения пациентам, но также сохраняли свою стабильность при хранении и последующем использовании. Например, терапевтические антитела в жидком растворе предрасположены к деградации, агрегации или нежелательным химическим модификациям, если раствор сформулирован неправильно. Стабильность антитела в жидкой композиции зависит не только от характера эксципиентов, используемых для формулирования, но также от количеств и пропорционального содержания эксципиентов относительно друг друга. Кроме того, и другие факторы, помимо стабильности, следует учитывать при изготовлении жидкой композиции антитела. Примеры таких дополнительных факторов включают вязкость раствора и концентрацию антитела, которое будет находиться в конкретной композиции, а также визуальное качество или внешний вид композиции. Таким образом, при формулировании терапевтического антитела следует принимать серьезные меры для получения композиции, которая остается стабильной, имеет адекватную концентрацию антитела и имеет подходящую вязкость, а также другие свойства, позволяющие успешно вводить композицию пациентам.

[004] Антитела к человеческому белку программируемой гибели клеток 1 (PD-1) являются одним из примеров терапевтических макромолекул, для которых необходимо надлежащее формулирование. Анти-PD-1 антитела могут быть использованы в клинической практике для лечения рака (например, рака легкого, меланомы и рака мозга), а также вирусных инфекций и аутоиммунных заболеваний. Иллюстративные анти-PD-1 антитела описаны, в частности, в патентах/патентных публикациях США №№ 7101550, 7595048, 7488802, 7563869, 8008449, 8168757, 8216996, 20110008369, 20130017199, 20130022595, а также в WO2006121168, WO2009114335, WO2012145493, WO2013014668, WO2009101611, EP2262837 и EP2504028. В US20140234296 описаны лиофилизированные композиции анти-PD-1 антитела.

[005] Хотя анти-PD-1 антитела известны, в данной области сохраняется

потребность в новых фармацевтических композициях, содержащих анти-PD-1 антитела, которые являются достаточно стабильными и подходящими для введения пациентам.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Настоящее изобретение удовлетворяет вышеуказанную потребность за счет предложения стабильных фармацевтических композиций, содержащих человеческое антитело, которое специфически связывает человеческий белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1).

[007] В одном аспекте предложен стабильный низковязкая жидкий фармацевтическая композиция, содержащая: (i) человеческое антитело, которое специфически связывает человеческий белок программируемой гибели клеток (PD-1); (ii) буфер; (iii) органический соразтворитель; (iv) стабилизатор и (v) модификатор вязкости.

[008] В различных вариантах осуществления предложено антитело в концентрации от примерно $5 \pm 0,75$ мг/мл до примерно $250 \pm 37,5$ мг/мл. В одном варианте осуществления предложено антитело в концентрации $12,5$ мг/мл $\pm 1,85$ мг/мл или примерно $12,5$ мг/мл. В одном варианте осуществления предложено антитело в концентрации 25 мг/мл $\pm 3,75$ мг/мл или примерно 25 мг/мл. В другом варианте осуществления предложено антитело в концентрации 50 мг/мл $\pm 7,5$ мг/мл или примерно 50 мг/мл. В другом варианте осуществления предложено антитело в концентрации 100 мг/мл ± 15 мг/мл или примерно 100 мг/мл. В одном варианте осуществления предложено антитело в концентрации 150 мг/мл $\pm 22,5$ мг/мл или примерно 150 мг/мл. В другом варианте осуществления предложено антитело в концентрации 175 мг/мл $\pm 26,25$ мг/мл или примерно 175 мг/мл. В другом варианте осуществления предложено антитело в концентрации 200 мг/мл ± 30 мг/мл или примерно 200 мг/мл.

[009] В конкретных вариантах осуществления композиция содержит любое из анти-PD-1 антител, раскрытых в публикации патентной заявки США №: 20150203579, полное содержание которой включено в настоящий документ. В конкретных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую определяющие комплементарность области 1, 2 и 3 тяжелой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3), каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, соответственно; и (b) вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую определяющие комплементарность области 1, 2 и 3 легкой цепи (LCDR1-LCDR2-LCDR3), каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно. В одном варианте осуществления антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

10. В одном варианте осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 11; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления антитело содержит HCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления антитело содержит LCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления антитело содержит HCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и LCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

[010] В одном варианте осуществления pH жидкой композиции составляет pH $6,0 \pm 0,5$, pH $6,0 \pm 0,4$, pH $6,0 \pm 0,3$, pH $6,0 \pm 0,2$, pH $6,0 \pm 0,1$, pH $6,0 \pm 0,05$, pH $6,0 \pm 0,01$ или pH 6,0. В одном варианте осуществления pH жидкой композиции составляет примерно pH $6,0 \pm 0,3$.

[011] В одном варианте осуществления буфер содержит гистидин. В конкретных вариантах осуществления гистидиновый буфер имеет концентрацию от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $50 \text{ мМ} \pm 10 \text{ мМ}$, предпочтительно от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $25 \text{ мМ} \pm 5 \text{ мМ}$. В одном варианте осуществления гистидиновый буфер имеет концентрацию $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$ или примерно 10 мМ. В одном варианте осуществления гистидиновый буфер имеет концентрацию $20 \text{ мМ} \pm 4 \text{ мМ}$ или примерно 20 мМ. В одном варианте осуществления гистидиновый буфер имеет концентрацию $40 \text{ нМ} \pm 8 \text{ мМ}$ или примерно 40 нМ. В конкретных вариантах осуществления гистидиновый буфер содержит L-гистидин и L-гистидин моногидрохлорид моногидрат. В одном варианте осуществления L-гистидин имеет концентрацию от $2 \text{ мМ} \pm 0,4 \text{ мМ}$ до $25 \text{ мМ} \pm 5 \text{ мМ}$, предпочтительно от $4 \text{ мМ} \pm 0,8 \text{ мМ}$ до $20 \text{ мМ} \pm 4 \text{ мМ}$. В одном варианте осуществления L-гистидин моногидрохлорид моногидрат имеет концентрацию от $2 \text{ мМ} \pm 0,4 \text{ мМ}$ до $25 \text{ мМ} \pm 5 \text{ мМ}$, предпочтительно от $4 \text{ мМ} \pm 0,8 \text{ мМ}$ до $20 \text{ мМ} \pm 4 \text{ мМ}$. В одном варианте осуществления буфер содержит L-гистидин в концентрации $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ и L-гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$. В одном варианте осуществления буфер содержит гистидин в концентрации $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$, при этом гистидин представляет собой L-гистидин в концентрации $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ и L-гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$.

[012] В конкретных вариантах осуществления органический соразтворитель представляет собой неионный полимер, содержащий полиоксиэтиленовый фрагмент. В одном варианте осуществления органический растворитель представляет собой сурфактант. В некоторых вариантах осуществления органический соразтворитель представляет собой любой один или более из полисорбата, полуксамера 188 и полиэтиленгликоля 3350. В одном варианте осуществления органический соразтворитель представляет собой полисорбат 80. В одном варианте осуществления органический соразтворитель представляет собой полисорбат 20.

[013] В одном варианте осуществления органический соразтворитель имеет

концентрацию от примерно $0,01\% \pm 0,005\%$ до примерно $1\% \pm 0,5\%$ «массы на объем» или «масс/об», при этом, например, $0,1 \text{ г/мл} = 10\%$ и $0,01 \text{ г/мл} = 1\%$. В конкретных вариантах осуществления органический растворитель представляет собой полисорбат в концентрации от $0,05\% \pm 0,025\%$ до $0,5\% \pm 0,25\%$ (масс/об). В одном варианте осуществления органический соразтворитель представляет собой полисорбат 80, который имеет концентрацию $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об или примерно $0,2\%$. В другом варианте осуществления органический соразтворитель представляет собой полисорбат 80, который имеет концентрацию $0,1\% \pm 0,05\%$ масс/об или примерно $0,1\%$ масс/об. В одном варианте осуществления органический соразтворитель представляет собой полисорбат 20, который имеет концентрацию $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об или примерно $0,2\%$. В другом варианте осуществления органический соразтворитель представляет собой полисорбат 20, который имеет концентрацию $0,1\% \pm 0,05\%$ масс/об или примерно $0,1\%$ масс/об.

[014] В конкретных вариантах осуществления стабилизатор представляет собой сахар. В одном варианте осуществления сахар представляет собой сахарозу. В различных вариантах осуществления стабилизатор имеет концентрацию от $1\% \pm 0,2\%$ масс/об до $20\% \pm 4\%$ масс/об, от $5\% \pm 1\%$ масс/об до $15\% \pm 3\%$ масс/об или от $1\% \pm 0,2\%$ до $10\% \pm 2\%$ масс/об. В одном варианте осуществления стабилизатор представляет собой сахарозу в концентрации $5\% \pm 1\%$ масс/об или примерно 5% масс/об. В другом варианте осуществления стабилизатор представляет собой сахарозу в концентрации $9\% \pm 1,8\%$ масс/об или примерно 9% масс/об. В другом варианте осуществления стабилизатор представляет собой сахарозу в концентрации $10\% \pm 2\%$ масс/об или примерно 10% масс/об.

[015] В одном варианте осуществления модификатор вязкости представляет собой аминокислоту. В одном варианте осуществления модификатор вязкости представляет собой L-пролин. В конкретных вариантах осуществления модификатор вязкости имеет концентрацию от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ масс/об. В одном варианте осуществления модификатор вязкости представляет собой пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ или примерно $1,5\%$. В одном варианте осуществления модификатор вязкости представляет собой пролин в концентрации $3\% \pm 0,6\%$, или примерно 3% .

[016] В конкретных вариантах осуществления вязкость жидкой фармацевтической композиции при 25°C меньше или равна примерно 15 сантипуаз $\pm 10\%$. В конкретных вариантах осуществления вязкость при 25°C составляет от $1,0$ сантипуаз $\pm 10\%$ до 20 сантипуаз $\pm 10\%$. В конкретных вариантах осуществления вязкость жидкой фармацевтической композиции составляет ≤ 15 сантипуаз. В конкретных вариантах осуществления вязкость жидкой фармацевтической композиции составляет ≤ 20 сантипуаз. В конкретных вариантах осуществления вязкость жидкой фармацевтической композиции составляет ≤ 10 сантипуаз. В конкретных вариантах осуществления вязкость при 25°C составляет 5 сантипуаз $\pm 10\%$, $6,0$ сантипуаз $\pm 10\%$, $7,0$ сантипуаз $\pm 10\%$, $7,1$ сантипуаз $\pm 10\%$, $7,2$ сантипуаз $\pm 10\%$, $7,9$ сантипуаз $\pm 10\%$, $8,3$ сантипуаз $\pm 10\%$, $9,0$ сантипуаз $\pm 10\%$, $9,6$ сантипуаз $\pm 10\%$, $10,0$ сантипуаз $\pm 10\%$, $10,6$ сантипуаз $\pm 10\%$, $11,4$

сантипуаз $\pm 10\%$, 11,6 сантипуаз $\pm 10\%$, 11,8 сантипуаз $\pm 10\%$, 12,0 сантипуаз $\pm 10\%$, 13,0 сантипуаз $\pm 10\%$, 14,0 сантипуаз $\pm 10\%$, 15,0 сантипуаз $\pm 10\%$ или 16 сантипуаз $\pm 10\%$.

[017] В одном аспекте предложена стабильная низковязкая жидкая фармацевтическая композиция, содержащая: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл человеческого антитела, которое специфически связывает PD-1 человека; (ii) от 0 мМ до 40 ± 8 мМ гистидинового буфера; (iii) от 0% до $0,5\% \pm 0,25\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) от 0% до $15\% \pm 3\%$ (масс/об) сахарозы и (v) от 0 до $5\% \pm 1\%$ пролина, при pH от примерно 5,3 до примерно 6,7; при этом анти-PD-1 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), так что сочетание HCVR/LCVR включает определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-4-5/SEQ ID NO: 6-7 - 8, соответственно. В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно. В конкретных вариантах осуществления анти-PD1 антитело содержит Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc-областей изотипов IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4 человека. В одном варианте осуществления антитело имеет изотип IgG4 человека. В одном варианте осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 11; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления антитело имеет молекулярную массу 143 кДа ± 5 кДа.

[018] В конкретных вариантах осуществления предложена стабильная низковязкая жидкая фармацевтическая композиция, содержащая: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл человеческого антитела, которое специфически связывает PD-1 человека; (ii) от 0 мМ до 40 ± 8 мМ гистидинового буфера; (iii) от 0% до $0,5\% \pm 0,25\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) от 0% до $15\% \pm 3\%$ (масс/об) сахарозы и (v) от 0 до $5\% \pm 1\%$ пролина, при pH от примерно 5,3 до примерно 6,7; при этом анти-PD-1 антитело содержит HCVR и LCVR, причем HCVR имеет 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и/или LCVR имеет 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную

из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 11; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

[019] В конкретных вариантах осуществления предложена стабильная низковязкая жидкая фармацевтическая композиция, содержащая: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл человеческого антитела, которое специфически связывает PD-1 человека; (ii) от 0 мМ до 40 ± 8 мМ гистидинового буфера; (iii) от 0% до $0,5\% \pm 0,25\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) от 0% до $15\% \pm 3\%$ (масс/об) сахарозы и (v) от 0 до $5\% \pm 1\%$ пролина, при pH от примерно 5,3 до примерно 6,7; при этом анти-PD-1 антитело содержит HCVR и LCVR, причем HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, имеющую не более пяти аминокислотных замен, и LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, имеющую не более двух аминокислотных замен. В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 11; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

[020] В конкретных вариантах осуществления композиция по любому из предшествующих аспектов имеет признак, выбранный из группы, состоящей из следующего: (i) композиция стабильна при долгосрочном хранении при 25°C , 5°C , -20°C , -30°C и -80°C , как описано в настоящем документе; (ii) композиция устойчива к стрессу, вызываемому перемешиванием, как описано в настоящем документе; (iii) композиция имеет низкую вязкость (вязкость менее 20 сантипуаз, предпочтительно менее 15 сантипуаз); (iv) композиция стабильна даже при вариациях в концентрациях эксципиентов композиции вплоть до $\pm 50\%$, как описано в настоящем документе; (v) композиция является изоосмолярной с физиологическими условиями; (vi) композиция стабильна и совместима с устройствами и процедурами для внутривенной доставки и (vii) композиция стабильна при долгосрочном хранении в стеклянном флаконе или в предварительно заполненном шприце.

[021] В конкретных вариантах осуществления данного аспекта предложена стабильная жидкая композиция, содержащая: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл человеческого антитела, которое специфически связывает PD-1 человека; (ii) от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до 20 ± 4 мМ гистидинового буфера; (iii) от $0,05\% \pm 0,025\%$ до $0,3\% \pm 0,15\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) от $1\% \pm 0,2\%$ до $10\% \pm 2\%$ (масс/об) сахарозы и (v) от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ пролина, при pH примерно 6,0, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция по данному аспекту имеет вязкость менее 15 сП. В одном варианте осуществления $>90\%$ антител имеют молекулярную массу $143 \text{ кДа} \pm 1 \text{ кДа}$. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 20 сП, менее 15 сП или

менее 10 сП. В одном варианте осуществления более 96% антител имеют нативную конформацию при хранении в течение 12 месяцев при 5°C. В одном варианте осуществления по меньшей мере 97%, или более, антитела имеет нативную конформацию при хранении при -80°C, -30°C и/или -20°C в течение 6 месяцев.

[022] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $25 \pm 3,75$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидинового буфера; (iii) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (v) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2.

[023] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $25 \pm 3,75$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ L-гистидина; (iii) $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; (iv) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (vi) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2.

[024] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $50 \pm 7,5$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидинового буфера; (iii) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (v) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2. В одном варианте осуществления данной конкретной композиции вязкость составляет менее 10 сантипуаз.

[025] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $50 \pm 7,5$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ L-гистидина; (iii) $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; (iv) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (vi) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2.

[026] В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит (i) 100 ± 15 мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидинового буфера; (iii) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (v) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2. В одном варианте осуществления данной конкретной композиции вязкость составляет менее 10 сантипуаз.

[027] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) 100 ± 15 мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ L-гистидина; (iii) $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; (iv) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (vi) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR,

содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2.

[028] В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит (i) $150 \pm 22,5$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) 10 ± 2 mM гистидинового буфера; (iii) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) $10\% \pm 2\%$ (масс/об) сахарозы и (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2. В одном варианте осуществления данной конкретной композиции вязкость составляет менее 20 сантипуаз, предпочтительно менее 15 сантипуаз.

[029] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $150 \pm 22,5$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) $4,8 \text{ mM} \pm 0,96 \text{ mM}$ L-гистидина; (iii) $5,2 \text{ mM} \pm 1,04 \text{ mM}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; (iv) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (vi) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2.

[030] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $175 \pm 26,25$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) 10 ± 2 mM гистидинового буфера; (iii) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы и (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2. В одном варианте осуществления данной конкретной композиции вязкость составляет менее 20 сантипуаз, предпочтительно менее 15 сантипуаз.

[031] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $175 \pm 26,25$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) $4,8 \text{ mM} \pm 0,96 \text{ mM}$ L-гистидина; (iii) $5,2 \text{ mM} \pm 1,04 \text{ mM}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; (iv) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (vi) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2.

[032] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $200 \pm 30,00$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) 10 ± 2 mM гистидинового буфера; (iii) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы и (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2. В одном варианте осуществления данной конкретной композиции вязкость составляет менее 20 сантипуаз.

[033] В одном варианте осуществления данного аспекта стабильная жидкая композиция содержит (i) $200 \pm 30,00$ мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) $4,8 \text{ mM} \pm 0,96 \text{ mM}$ L-гистидина; (iii) $5,2 \text{ mM} \pm 1,04 \text{ mM}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; (iv) $0,2\% \pm 0,1\%$ (масс/об) полисорбата 80; (v) $1,5\% \pm 0,3\%$ (масс/об) пролина и (vi) $5\% \pm 1\%$ (масс/об) сахарозы, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2.

[034] В одном варианте осуществления после хранения композиции при 45° в течение 28 дней $\geq 90\%$ антител остаются нативными и $\geq 35\%$ антител находятся в основной заряженной форме. В одном варианте осуществления после хранения композиции при 25° в течение трех месяцев $> 94\%$ антител остаются нативными и $\geq 44\%$ антител находятся в основной заряженной форме. В одном варианте осуществления после хранения композиции при 5° в течение 12 месяцев $> 96\%$ антител остаются нативными и $> 50\%$ антител находятся в основной заряженной форме. В одном варианте осуществления после хранения композиции при -20° в течение 12 месяцев $> 96\%$ антител остаются нативными и $> 40\%$ антител находятся в основной заряженной форме. В одном варианте осуществления после хранения композиции при -30° в течение 12 месяцев $> 96\%$ антител остаются нативными и $> 40\%$ антител находятся в основной заряженной форме. В одном варианте осуществления после хранения композиции при -80° в течение 12 месяцев $> 96\%$ антител остаются нативными и $> 40\%$ антител находятся в основной заряженной форме. В одном варианте осуществления более 96% антител имеют нативную конформацию при хранении в течение 12 месяцев при 5°C. В одном варианте осуществления по меньшей мере 97% или более антител имеют нативную конформацию при хранении при -80°C, -30°C и/или -20°C в течение 6 месяцев.

[035] В одном аспекте настоящее изобретение относится к стабильной жидкой композиции, содержащей: (i) до 100 мг/мл анти-PD-1 антитела; (ii) от 2 mM \pm 0,4 mM до 20 mM \pm 4 mM гистидинового буфера; (iii) до 20% \pm 4% (масс/об) сахарозы и (iv) до 0,2% \pm 0,1% масс/об полисорбата, при pH 6,0 \pm 0,3. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 25 мг/мл анти-PD-1 антитела. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 50 мг/мл анти-PD-1 антитела. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 75 мг/мл анти-PD-1 антитела. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 10 mM \pm 2 mM гистидинового буфера. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 5% сахарозы. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 6% сахарозы. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 9% сахарозы. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 10% сахарозы. В одном варианте осуществления стабильная жидкая композиция содержит 0,1% полисорбата. В одном варианте осуществления полисорбат представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20. В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело содержит HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 1/2.

[036] В одном аспекте стабильная жидкая фармацевтическая композиция жидкая фармацевтическая композиция по любому из предшествующих аспектов предоставляют в контейнере. В одном варианте осуществления контейнер представляет собой поликарбонатный флакон. В одном варианте осуществления контейнер представляет собой стеклянный флакон. В одном варианте осуществления стеклянный флакон представляет собой флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой из бутилкаучука, имеющей фторуглеродное покрытие. В одном варианте осуществления контейнер

представляет собой микроинфузионное устройство. В одном варианте осуществления контейнер представляет собой шприц. В другом варианте осуществления контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. В одном варианте осуществления шприц имеет поршень с фторуглеродным покрытием. В конкретных вариантах осуществления шприц представляет собой 1-мл или 2,25-мл стеклянный шприц, имеющий содержание вольфрама менее примерно 500 частей на миллион, оснащенный иглой 27-G, пробкой из бутилкаучука, имеющей фторуглеродное покрытие, и не содержащим латекс не цитотоксическим резиновым колпачком наконечника. В одном варианте осуществления шприц представляет собой 1-мл стеклянный шприц, оснащенный тонкостенной иглой 27-G, покрытой FLUROTEC резиновой пробкой 4023/50 и резиновым колпачком наконечника FM 27. В одном варианте осуществления шприц представляет собой 1-мл, 2-мл, 3-мл, 5-мл или 10-мл пластиковый шприц, оснащенный иглой.

[037] В одном аспекте предложен набор, включающий стабильную фармацевтическую композицию по любому из предшествующих аспектов, контейнер и инструкции. В одном варианте осуществления контейнер представляет собой стеклянный флакон. В другом варианте осуществления контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. В одном варианте осуществления шприц представляет собой 1-мл или 2,25-мл стеклянный шприц, оснащенный тонкостенной иглой 27-G, покрытой FLUROTEC резиновой пробкой 4023/50 и резиновым колпачком наконечника FM 27. В одном варианте осуществления шприц представляет собой 1-мл, 2-мл, 3-мл, 5-мл или 10-мл пластиковый шприц, оснащенный иглой.

[038] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к предварительно заполненному шприцу, содержащему стабильную жидкую фармацевтическую композицию жидкая фармацевтическая композиция, содержащую: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл человеческого антитела, которое специфически связывает PD-1 человека; (ii) от 5 мМ ± 1 мМ до 20 ± 4 мМ гистидинового буфера; (iii) от $0,05\% \pm 0,025\%$ до $0,3\% \pm 0,15\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) от $1\% \pm 0,2\%$ до $10\% \pm 2\%$ (масс/об) сахарозы и (v) от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ пролина, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2; причем композиция композиция имеет признак, выбранный из группы, состоящей из следующего: (i) $\geq 98\%$ антител остаются нативными после хранения при 5°C в течение 12 месяцев; (ii) $\geq 53\%$ антител представляют собой основной заряженный вариант после хранения при 5°C в течение 12 месяцев; (iii) $\geq 97\%$ антител остаются нативными после хранения при 25°C в течение 6 месяцев; (iv) композиция устойчива к стрессу, вызываемому перемешиванием, при этом $\geq 98\%$ антител остаются нативными после 120 минут применения стресса, вызываемого перемешиванием, в предварительно заполненном шприце; (v) более 90% антител имеют молекулярную массу 143 кДа ± 1 кДа; (vi) фармацевтическая композиция композиция имеет вязкость менее 20 сП, менее 15 сП или менее 10 сП; (vii) более 96% антител имеют нативную конформацию при хранении в

течение 12 месяцев при 5°C и (viii) по меньшей мере 97% или более антител имеют нативную конформацию при хранении при -80°C, -30°C и/или -20°C в течение 6 месяцев.

[039] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к стеклянному флакону, содержащему стабильную жидкую фармацевтическую композицию жидкая фармацевтическая композиция, содержащую: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл человеческого антитела, которое специфически связывает PD-1 человека; (ii) от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $20 \pm 4 \text{ мМ}$ гистидинового буфера; (iii) от $0,05\% \pm 0,025\%$ до $0,3\% \pm 0,15\%$ (масс/об) полисорбата 80; (iv) от $1\% \pm 0,2\%$ до $10\% \pm 2\%$ (масс/об) сахарозы и (v) от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ пролина, при pH $6,0 \pm 0,3$, при этом антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1/2; причем композиция имеет признак, выбранный из группы, состоящей из следующих: (i) композиция стабильна при хранении и стрессе в стеклянном флаконе; (ii) композиция стабильна и совместима с использованием в устройствах для в/в доставки; (iii) композиция химически и физически стабильна при разбавлении стандартными разбавителями, известными в данной области (такими как, например, 0,9% раствор хлорида натрия или 5% раствор декстрозы); (iv) композиция стабильна в емкостях для в/в введения, выполненных из стекла или полимерного пластика (такого как, например, поливинилхлорид, фталаты, полиолефины или полипропилен); (v) композиция совместима со стандартными инфузионными насосами (например, перистальтическим насосом, беспоршневым насосом); (vi) $\geq 90\%$ антител имеют молекулярную массу $143 \text{ кДа} \pm 1 \text{ кДа}$; (vii) фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 20 сП, менее 15 сП или менее 10 сП; (viii) более 96% антител имеют нативную конформацию при хранении в течение 12 месяцев при 5°C; и (ix) по меньшей мере 97% или более антител имеют нативную конформацию при хранении при -80°C, -30°C и/или -20°C в течение 6 месяцев.

[040] Другие варианты осуществления станут понятными после ознакомления с приведенным далее подробным описанием.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[041] На Фигуре 1 приведена таблица, показывающая эффект pH на стабильность 150 мг/мл композиции мАт1, инкубированной при 45°C в течение 28 дней. ^aРезультаты ЭХ-СЭЖХ и КО-СЭЖХ для «исходного материала» представляют собой средние показатели исходного материала для всех композиций.

[042] На Фигуре 2 показана стабильность при хранении трех композиций F1, F2 и F3, при этом F1 содержит 210 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидина и 3% пролина, при pH 6,0; F2 содержит 210 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидина и 3% сахарозы, при pH 6,0; и F3 содержит 210 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидина и 5% сахарозы, при pH 6,0. Стабильность при хранении измерена на основании % высокомолекулярных (ВМ) вариантов, образующихся при хранении при -80°C (А), -30°C (В) и -20°C (С) в течение вплоть до 9 месяцев и проанализированных методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

[043] На Фигуре 3 показана стабильность при хранении трех композиций F1, F2 и F3, при этом F1 содержит 150 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидина, 9% сахарозы и 0,2%

полисорбата 80 (ПС 80), при pH 6,0; F2 содержит 175 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидина, 3% пролина и 0,2% ПС 80, при pH 6,0; и F3 содержит 175 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидина, 5% сахарозы, 1,5% пролина и 0,2% ПС 80, при pH 6,0. Стабильность при хранении измерена на основании % высокомолекулярных (ВМ) вариантов, образующихся при хранении при –80°C (А), –30°C (В) и –20°C (С) в течение вплоть до 6 месяцев и проанализированных методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

[044] На Фигуре 4 приведена таблица, показывающая вязкость 150 мг/мл композиций мАт1 при добавлении эксципиентов и модификаторов вязкости.

[045] На Фигуре 5 приведена таблица, показывающая эффект модификаторов вязкости на стабильность 175 мг/мл композиции мАт1, инкубированной при 45°C в течение 14 дней. ^aРезультаты pH, ЭХ–СЭЖХ и КО–СЭЖХ для «исходного материала» представляют собой средние показатели исходного материала для всех композиций.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[046] При изучении описания настоящих способов следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, служит исключительно для целей описания конкретных вариантов осуществления, и не должна быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен лишь прилагаемой формулой изобретения.

[047] Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. В настоящем документе термин «примерно», при использовании применительно к конкретному указанному числовому значению или диапазону значений, означает, что значение может отличаться от указанного значения не более, чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение «примерно 100» включает 99 и 101, а также все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и так далее). Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы на практике, или при тестировании, настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны в настоящем документе. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[048] Используемое в настоящем документе выражение «фармацевтическая композиция» означает сочетание из по меньшей мере одного активного ингредиента (например, малой молекулы, макромолекулы, соединения, и так далее, которые способны производить биологический эффект в организме человека или не являющегося человеком животного) и по меньшей мере одного неактивного ингредиента, который, при объединении с активным ингредиентом, или одним или более дополнительными неактивными ингредиентами, подходит для терапевтического введения человеку или не

являющемуся человеком животному. Используемый в настоящем документе термин «композиция» означает «фармацевтическая композиция», если специально не указано иначе. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере один терапевтический полипептид. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический полипептид представляет собой антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает человеческий белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1). Более конкретно, настоящее изобретение охватывает фармацевтические композиции, содержащие: (i) человеческое антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, (ii) гистидиновый буфер; (iii) органический соразтворитель, который представляет собой неионный сурфактант; (iv) стабилизатор, который представляет собой углевод; и, необязательно, (v) модификатор вязкости, который представляет собой аминокислоту. Конкретные иллюстративные компоненты и композиции, входящие в объем настоящего изобретения, описаны более подробно ниже.

Антитела, которые специфически связывают PD-1

[049] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать человеческое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PD-1 человека. Используемый в настоящем документе термин «PD-1» означает человеческий белок программируемой гибели клеток 1. Антитела к PD-1 человека описаны, например, в патентах/патентных публикациях США №№ 8008449, 8168757, 20110008369, 20130017199, 20130022595, 20150203579, а также в WO2006121168, WO2009114335, WO2012145493, WO2013014668, WO2009101611, WO2015112800, EP2262837 и EP2504028.

[050] Используемый в настоящем документе термин «антитело», как правило, относится к молекулам иммуноглобулинов, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также к их мультимерам (например, IgM); однако молекулы иммуноглобулинов, состоящие только из тяжелых цепей (то есть, лишенные легких цепей), также попадают под определение термина «антитело». Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (в настоящем документе сокращенно называемую HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (в настоящем документе сокращенно называемую LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно разделены на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[051] Если специально не указано иначе, используемый в настоящем документе термин «антитело» должен охватывать целые молекулы антител, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «часть антитела» или «фрагмент антитела») означают один или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связывать PD-1 человека или его эпитоп.

[052] Используемый в настоящем документе термин «выделенное антитело» означает антитело, которое практически свободно от других антител, имеющих иные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, является практически свободным от антител, которые специфически связывают антигены, отличные от PD-1 человека).

[053] Термин «специфически связывает», или аналогичные термины, означает, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, образует с антигеном комплекс, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может быть охарактеризовано величиной константы диссоциации, составляющей по меньшей мере примерно 1×10^{-8} М или более. Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс, и тому подобное. Выделенное антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, может, однако, иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы PD-1 других биологических видов (ортологи). В контексте настоящего изобретения полиспецифические (например, биспецифические) антитела, которые связывают PD-1 человека, а также один или более дополнительных антигенов, считают «специфически связывающими» PD-1 человека. Кроме того, выделенное антитело может быть практически свободным от другого клеточного материала или химических реагентов.

[054] Иллюстративные антитела против PD-1 человека, которые могут быть включены в фармацевтические композиции по настоящему изобретению, описаны в публикациях патентных заявок US20150203579 и WO2015112800, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[055] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4 и HCDR3 с SEQ ID NO: 5. В конкретных вариантах осуществления антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCVR с SEQ ID NO: 1.

[056] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8. В конкретных вариантах осуществления антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит LCVR с SEQ ID NO: 2.

[057] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCVR, имеющую 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

[058] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит LCVR, имеющую 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

[059] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, имеющую не более 5 аминокислотных замен.

[060] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, имеющую не более 2 аминокислотных замен.

[061] Идентичность последовательностей можно измерять любым способом, известным в данной области (например, GAP, BESTFIT и BLAST).

[062] Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим анти-PD-1 антитела, при этом анти-PD-1 антитела содержат варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, имеющие одну или более консервативных аминокислотных замен. Например, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим анти-PD-1 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее, и так далее, консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

[063] В конкретных вариантах осуществления анти-PD1 антитело содержит Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc-областей изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека.

[064] Неограничивающее иллюстративное антитело, используемое в примерах, приведенных в настоящем документе, называют «mAt1». Данное антитело в US 20150203579 также называют H2M7798N или H4H7798N, и оно также известно как «REGN2810» или «цемиплимаб». mAt1 (H4H7798N) содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, имеющих SEQ ID NO: 1/2, и домены HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3, представленные SEQ ID NO: 3-4 – 5/SEQ ID NO: 6-7 – 8.

[065] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 9 и легкую цепь с SEQ ID NO: 10.

[066] В данной области хорошо известно, что в процессе продуцирования антител может происходить концевое отщепление аминокислот (смотри, например, Wang et al.

2007, J. Pharma. Sci. 96: 1–26). Соответственно, в конкретных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи, в которой С-концевой остаток лизина отсутствует в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 98%, или более, анти-PD-1 антител, в которых отсутствует С-концевой остаток лизина.

[067] Количество антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащееся в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных необходимых свойств композиций, а также от конкретных обстоятельств и целей, для которых предназначены композиции. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции представляют собой жидкие композиции, которые могут содержать от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл антитела; от $10 \pm 1,5$ мг/мл до 240 ± 36 мг/мл антитела; от $20 \pm 3,0$ мг/мл до $230 \pm 34,5$ мг/мл антитела; от $25 \pm 3,75$ мг/мл до 240 ± 36 мг/мл антитела; от $50 \pm 7,5$ мг/мл до $230 \pm 34,5$ мг/мл антитела; от 60 ± 9 мг/мл до 240 ± 36 мг/мл антитела; от $70 \pm 10,5$ мг/мл до $230 \pm 34,5$ мг/мл антитела; от 80 ± 12 мг/мл до 220 ± 33 мг/мл антитела; от $90 \pm 13,5$ мг/мл до $210 \pm 31,5$ мг/мл антитела; от 100 ± 15 мг/мл до 200 ± 30 мг/мл антитела; от $110 \pm 16,5$ мг/мл до $190 \pm 28,5$ мг/мл антитела; от 120 ± 18 мг/мл до 180 ± 27 мг/мл антитела; от $130 \pm 19,5$ мг/мл до $170 \pm 25,5$ мг/мл антитела; от 140 ± 21 мг/мл до 160 ± 24 мг/мл антитела; $150 \pm 22,5$ мг/мл антитела или $175 \pm 26,25$ мг/мл. Например, композиции по настоящему изобретению могут содержать примерно 5 мг/мл; примерно 10 мг/мл; примерно 15 мг/мл; примерно 20 мг/мл; примерно 25 мг/мл; примерно 30 мг/мл; примерно 35 мг/мл; примерно 40 мг/мл; примерно 45 мг/мл; примерно 50 мг/мл; примерно 55 мг/мл; примерно 60 мг/мл; примерно 65 мг/мл; примерно 70 мг/мл; примерно 75 мг/мл; примерно 80 мг/мл; примерно 85 мг/мл; примерно 90 мг/мл; примерно 95 мг/мл; примерно 100 мг/мл; примерно 105 мг/мл; примерно 110 мг/мл; примерно 115 мг/мл; примерно 120 мг/мл; примерно 125 мг/мл; примерно 130 мг/мл; примерно 135 мг/мл; примерно 140 мг/мл; примерно 145 мг/мл; примерно 150 мг/мл; примерно 155 мг/мл; примерно 160 мг/мл; примерно 165 мг/мл; примерно 170 мг/мл; примерно 175 мг/мл; примерно 180 мг/мл; примерно 185 мг/мл; примерно 190 мг/мл; примерно 195 мг/мл; примерно 200 мг/мл; примерно 205 мг/мл; примерно 210 мг/мл; примерно 215 мг/мл; примерно 220 мг/мл; примерно 225 мг/мл; примерно 230 мг/мл; примерно 235 мг/мл; примерно 240 мг/мл; примерно 245 мг/мл или примерно 250 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-1 человека.

Экспципенты и pH

[068] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат один или более экспципентов. Используемый в настоящем документе термин «экспципент»

означает любое нетерапевтическое средство, добавляемое в композицию для достижения нужной консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта.

[069] В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению содержит по меньшей мере один органический соразворитель такого типа, и в таком количестве, который стабилизирует антитело против PD-1 человека в условиях грубой обработки или встряхивания, такого как, например, встряхивание на вихревой мешалке. В некоторых вариантах осуществления под «стабилизацией» понимают предотвращение образования более 3% агрегированных антител от общего количества антител (при выражении в молях) в процессе грубой обработки. В некоторых вариантах осуществления грубая обработка представляет собой перемешивание на вихревой мешалке раствора, содержащего антитело и органический соразворитель, в течение примерно 60 минут или примерно 120 минут.

[070] В конкретных вариантах осуществления органический соразворитель представляет собой неионный сурфактант, такой как алкилполи(этиленоксид). Конкретные неионные сурфактанты, которые могут быть включены в композиции по настоящему изобретению, включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полуксамеры, такие как полуксамер 181, полуксамер 188, полуксамер 407; или полиэтиленгликоль (PEG). Полисорбат 20 также известен как TWEEN 20, сорбитан монолаурат и полиоксиэтиленсорбитан монолаурат. Полуксамер 188 также известен как PLURONIC F68.

[071] Количество неионного сурфактанта, содержащееся в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных необходимых свойств композиций, а также от конкретных обстоятельств и целей, для которых предназначены композиции. В конкретных вариантах осуществления композиции могут содержать от $0,01\% \pm 0,005\%$ до $0,5\% \pm 0,25\%$ сурфактанта. Например, композиции по настоящему изобретению могут содержать примерно 0,005%; примерно 0,01%; примерно 0,02%; примерно 0,03%; примерно 0,04%; примерно 0,05%; примерно 0,06%; примерно 0,07%; примерно 0,08%; примерно 0,09%; примерно 0,1%; примерно 0,11%; примерно 0,12%; примерно 0,13%; примерно 0,14%; примерно 0,15%; примерно 0,16%; примерно 0,17%; примерно 0,18%; примерно 0,19%; примерно 0,20%; примерно 0,21%; примерно 0,22%; примерно 0,23%; примерно 0,24%; примерно 0,25%; примерно 0,26%; примерно 0,27%; примерно 0,28%; примерно 0,29%; примерно 0,30%; примерно 0,35%; примерно 0,40%; примерно 0,45%; примерно 0,46%; примерно 0,47%; примерно 0,48%; примерно 0,49%; примерно 0,50%; примерно 0,55% или примерно 0,575% полисорбата 20 или полисорбата 80.

[072] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или более стабилизаторов такого типа, и в таком количестве, который стабилизирует антитело против PD-1 человека в условиях теплового стресса. В некоторых вариантах осуществления под «стабилизацией» понимают поддержание более чем

примерно 91% антител в нативной конформации, когда раствор, содержащий антитело и тепловой стабилизатор, находится при температуре примерно 45°C в течение вплоть до примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления «стабилизация» означает, что менее примерно 6% антител агрегируют, когда раствор, содержащий антитело и тепловой стабилизатор, находится при температуре примерно 45°C в течение вплоть до примерно 28 дней. Используемый в настоящем документе термин «нативная» означает основную форму антитела при эксклюзионной хроматографии, которая, как правило, представляет собой интактное мономерное антитело. Термин «нативная» также означает не агрегированную и не деградированную форму антитела.

[073] В конкретных вариантах осуществления тепловой стабилизатор представляет собой сахар, такой как сахароза, количество которой, содержащееся в композиции, может варьироваться в зависимости от конкретных обстоятельств и целей, для которых предназначены композиции. В конкретных вариантах осуществления композиции могут содержать от примерно 1% до примерно 15% сахара; от примерно 2% до примерно 14% сахара; от примерно 3% до примерно 13% сахара; от примерно 4% до примерно 12% сахара; от примерно 5% до примерно 12% сахара; от примерно 6% до примерно 11% сахара; от примерно 7% до примерно 10% сахара; от примерно 8% до примерно 11% сахара или от примерно 9% до примерно 11% сахара. Например, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать 4% ± 0,8%; 5% ± 1%; 6% ± 1,2%; 7% ± 1,4%; 8% ± 1,6%; 9% ± 1,8%; 10% ± 2%; 11% ± 2,2%; 12% ± 2,4%; 13% ± 2,6% или примерно 14% ± 2,8% сахара (например, сахарозы).

[074] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать буфер, или буферную систему, который служит для поддержания стабильного pH и для облегчения стабилизации антитела против PD-1 человека. Используемый в настоящем документе термин «буфер» означает фармацевтически приемлемый буфер, который стабильно поддерживает pH или препятствует изменению pH раствора. В предпочтительных вариантах осуществления буфер содержит гистидин. В контексте настоящего изобретения «гистидиновый буфер», или «буфер, содержащий гистидин», представляет собой буфер, содержащий аминокислоту гистидин. Примеры гистидиновых буферов включают гистидина хлорид, гистидина ацетат, гистидина фосфат и гистидина сульфат. В предпочтительном варианте осуществления гистидиновый буфер получают путем растворения L-гистидина и L-гистидина гидрохлорида (например, в виде моногидрата) в определенном количестве и соотношении. В одном варианте осуществления гистидиновый буфер получают путем титрования L-гистидина (свободное основание, твердое вещество) разбавленной соляной кислотой. В тексте настоящей заявки термин «гистидин» используют взаимозаменяемо с термином «гистидиновый буфер». В некоторых вариантах осуществления «стабилизация» означает, что менее 4,5% ± 0,5% антител агрегируют, когда раствор, содержащий антитело и буфер, находится при температуре примерно 45°C в течение вплоть до примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления «стабилизация» означает, что менее 3% ± 0,5% или менее 2,5%

$\pm 0,5\%$ антител агрегируют, когда раствор, содержащий антитело и буфер, находится при температуре примерно 37°C в течение вплоть до примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления «стабилизация» означает, что по меньшей мере $93\% \pm 0,5\%$ или по меньшей мере $94\% \pm 0,5\%$ антител находятся в нативной конформации при эксклюзионной хроматографии, когда раствор, содержащий антитело и буфер, находится при температуре примерно 45°C в течение вплоть до примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления «стабилизация» означает, что по меньшей мере $94\% \pm 0,5\%$ или по меньшей мере $95\% \pm 0,5\%$ антител находятся в нативной конформации при эксклюзионной хроматографии, когда раствор, содержащий антитело и буфер, находится при температуре примерно 37°C в течение вплоть до примерно 28 дней. Термин «нативная», или «нативная конформация», относится к фракции антитела, которое не является агрегированным или деградированным. Это, как правило, определяют в анализе, позволяющем измерять относительный размер молекул антитела, таком как анализ методом эксклюзионной хроматографии. Не агрегированное и не деградированное антитело элюируется во фракции, которая соответствует нативному антителу, и, как правило, является основной элюируемой фракцией. Агрегированное антитело элюируется во фракции, которая соответствует соединениям большего размера, чем нативное антитело. Деградированное антитело элюируется во фракции, которая соответствует соединениям меньшего размера, чем нативное антитело.

[075] В некоторых вариантах осуществления «стабилизация» означает, что по меньшей мере $35\% \pm 0,5\%$ антител находятся в основной заряженной форме при катионообменной хроматографии, когда раствор, содержащий антитело и буфер, находится при температуре примерно 45°C в течение вплоть до примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления «стабилизация» означает, что по меньшей мере $46\% \pm 0,5\%$ или по меньшей мере $39\% \pm 0,5\%$ антител находятся в основной заряженной форме при катионообменной хроматографии, когда раствор, содержащий антитело и буфер, находится при температуре примерно 37°C в течение вплоть до примерно 28 дней. Термин «основной заряд», или «основная заряженная форма», относится к фракции антитела, которая элюируется с ионообменной смолы в основном пике, который, как правило, фланкирован более «щелочными» пиками с одной стороны и более «кислыми» пиками с другой стороны.

[076] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут иметь рН от примерно 5,2 до примерно 6,4. Например, композиции по настоящему изобретению могут иметь рН примерно 5,5; примерно 5,6; примерно 5,7; примерно 5,8; примерно 5,9; примерно 6,0; примерно 6,1; примерно 6,2; примерно 6,3; примерно 6,4 или примерно 6,5. В некоторых вариантах осуществления рН составляет $6,0 \pm 0,4$; $6,0 \pm 0,3$; $6,0 \pm 0,2$; $6,0 \pm 0,1$; примерно 6,0 или 6,0.

[077] В некоторых вариантах осуществления буфер, или буферная система, включает по меньшей мере один буфер, который имеет буферный диапазон, перекрывающийся, полностью или частично, диапазон рН 5,5–7,4. В конкретных вариантах

осуществления буфер представляет собой гистидиновый буфер. В конкретных вариантах осуществления гистидиновый буфер присутствует в концентрации от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $15 \text{ мМ} \pm 3 \text{ мМ}$; от $6 \text{ мМ} \pm 1,2 \text{ мМ}$ до $14 \text{ мМ} \pm 2,8 \text{ мМ}$; от $7 \text{ мМ} \pm 1,4 \text{ мМ}$ до $13 \text{ мМ} \pm 2,6 \text{ мМ}$; от $8 \text{ мМ} \pm 1,6 \text{ мМ}$ до $12 \text{ мМ} \pm 2,4 \text{ мМ}$; от $9 \text{ мМ} \pm 1,8 \text{ мМ}$ до $11 \text{ мМ} \pm 2,2 \text{ мМ}$; $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$ или примерно 10 мМ . В конкретных вариантах осуществления буферная система содержит гистидин в концентрации $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$ при $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$. В предпочтительных вариантах осуществления гистидиновый буфер содержит L-гистидин и L-гистидин моногидрохлорид моногидрат. В одном варианте осуществления гистидиновый буфер содержит L-гистидин в концентрации $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$. В одном варианте осуществления гистидиновый буфер содержит L-гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$. В одном варианте осуществления гистидиновый буфер содержит L-гистидин в концентрации $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ и L-гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$.

[078] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или более эксципиентов, которые служат для поддержания сниженной вязкости или для снижения вязкости композиций, содержащих высокую концентрацию лекарственную субстанции анти-PD-1 антитела (например, как правило $\geq 150 \text{ мг/мл}$ антитела). В конкретных вариантах осуществления модификатор вязкости представляет собой аминокислоту. В одном варианте осуществления аминокислота представляет собой пролин. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит пролин, предпочтительно в виде L-пролина, в концентрации 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5%. В тексте настоящей заявки термин «пролин» используют взаимозаменяемо с термином «L-пролин». В некоторых вариантах осуществления композиция содержит пролин в количестве, достаточном для поддержания вязкости жидкой композиции на уровне менее 20 ± 3 сантипуаз, менее $15 \pm 2,25$ сантипуаз или менее $11 \pm 1,65$ сантипуаз. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит пролин в количестве, достаточном для поддержания вязкости на уровне, или ниже, $15 \pm 2,25$ сантипуаз. В конкретных вариантах осуществления композиция может содержать от примерно 1% до примерно 5% пролина; от примерно 2% до примерно 4% пролина или примерно 3% пролина. Например, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать $1\% \pm 0,2\%$; $1,5\% \pm 0,3\%$; $2\% \pm 0,4\%$; $2,5\% \pm 0,5\%$; $3\% \pm 0,6\%$; $3,5\% \pm 0,7\%$; $4\% \pm 0,8\%$; $4,5\% \pm 0,9\%$ или примерно $5\% \pm 1\%$ пролина.

[079] В процессе очистки антитела может быть желательно, или необходимо, заменять один буфер на другой для достижения соответствующей концентрации эксципиентов, концентрации антитела, pH и так далее. Замену буфера можно осуществлять, например, методом ультрафильтрации/диализации (УФ/ДФ) с использованием, например, полупроницаемой мембраны для тангенциальной поточной фильтрации. Однако использование таких методов может вызывать эффект Гиббса-Доннана [Bolton et al., 2011, Biotechnol. Prog. 27(1): 140–152]. Нарастание положительного заряда на обращенной к продукту стороне мембраны при концентрировании белка

компенсируется электрически за счет предпочтительного движения положительных ионов к противоположной стороне мембраны. Потенциальным последствием этого явления является то, что конечные концентрации некоторых компонентов (например, гистидина, L-пролина и так далее) могут быть ниже, чем намеченные целевые концентрации этих компонентов, вследствие электростатического отталкивания положительно заряженных эксципиентов буфера для диафильтрации и положительно заряженного белка антитела на этапе УФ/ДФ. Таким образом, настоящее изобретение охватывает композиции, в которых концентрация, например, гистидина и/или L-пролина отличается от количеств или диапазонов, указанных в настоящем документе, вследствие эффекта Гиббса–Доннана.

[080] Исключение объема описывает состояние высококонцентрированных образцов, при котором значительная часть общего объема раствора занята растворенными веществами, особенно крупными молекулами, такими как белки, с исключением растворителя из этого пространства. Это приводит к уменьшению общего объема растворителя, доступного для растворения других веществ, результатом чего может являться неравное распределение веществ по обе стороны ультрафильтрационной мембраны. Таким образом, настоящее изобретение охватывает композиции, в которых концентрация, например, гистидина и/или L-пролина, может отличаться от количеств или диапазонов, указанных в настоящем документе, вследствие эффекта исключения объема.

[081] В процессе производства композиций по настоящему изобретению могут иметь место вариации составов композиции. Эти вариации могут включать вариации концентрации активного ингредиента, концентрации эксципиентов и/или pH композиции. Поскольку изменения в любом из этих параметров могут потенциально влиять на стабильность или активность лекарственного продукта, были проведены исследования достоверного допустимого диапазона (ДДД) для оценки того, будут ли вариации составов, в установленных диапазонах, влиять на стабильность или активность антитела. Соответственно, настоящее изобретение охватывает композиции, содержащие анти-PD-1 антитела, которые являются стабильными и сохраняют активность при вариациях концентрации эксципиентов вплоть до 50%. Например, в настоящем документе описаны композиции анти-PD-1 антитела, стабильность и активность которых не изменяется при вариациях концентрации антитела, сахарозы, гистидинового буфера и/или полисорбата, составляющих $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, $\pm 30\%$, $\pm 40\%$ или $\pm 50\%$.

Стабильность и вязкость фармацевтических композиций

[082] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, как правило, проявляют высокий уровень стабильности. Используемый в настоящем документе термин «стабильные» применительно к фармацевтическим композициям означает, что антитела в фармацевтических композициях сохраняют приемлемую степень химической структуры или биологической функции после хранения в определенных условиях. Композиция может быть стабильной, даже если содержащееся в нем антитело не сохраняет 100% его химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. В определенных обстоятельствах сохранение примерно

90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% структуры или функции антитела после хранения в течение определенного количества времени может рассматриваться, как «стабильность».

[083] Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентной доли нативных антител, сохраняющихся в композиции после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре. Процентную долю нативных антител можно определять, в частности, методами эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии [ЭХ–СЭЖХ]), при этом «нативные» означает не агрегированные и не деградированные. Используемое в настоящем документе выражение «приемлемая степень стабильности» означает, что по меньшей мере 90% антител в нативной форме может быть обнаружено в композиции после хранения в течение определенного количества времени при конкретной температуре. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере примерно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% антител в нативной форме может быть обнаружено в композиции после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре. Определенное количество времени, после которого измеряют стабильность, может составлять по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца, или более. Определенная температура, при которой можно хранить фармацевтическую композицию при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от примерно -80°C до примерно 45°C , например, хранение при примерно -80°C , примерно -30°C , примерно -20°C , примерно 0°C , примерно $4^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$, примерно 5°C , примерно 25°C , примерно 35°C , примерно 37°C или примерно 45°C . Например, фармацевтическую композицию можно считать стабильной, если после 6 месяцев хранения при 5°C более примерно 95%, 96%, 97% или 98% антител в нативной форме может быть обнаружено методом ЭХ–СЭЖХ. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 6 месяцев хранения при 25°C более примерно 95%, 96%, 97% или 98% антител в нативной форме обнаружено методом ЭХ–СЭЖХ. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 28 дней хранения при 45°C более примерно 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% или 96% антител в нативной форме обнаружено методом ЭХ–СЭЖХ. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 12 месяцев хранения при -20°C более примерно 96%, 97% или 98% антител в нативной форме обнаружено методом ЭХ–СЭЖХ. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 12 месяцев хранения при -30°C более примерно 96%, 97% или 98% антител в нативной форме обнаружено методом ЭХ–СЭЖХ. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 12 месяцев

хранения при -80°C более примерно 96%, 97% или 98% антител в нативной форме обнаружено методом ЭХ–СЭЖХ.

[084] Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентной доли антител, образующих агрегаты в композиции после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре, при этом стабильность обратно пропорциональна процентной доле образовавшихся агрегатов. Процентную долю агрегированных антител можно определять, в частности, методом эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии [ЭХ–СЭЖХ]). Используемое в настоящем документе выражение «приемлемая степень стабильности» означает, что не более 5% антител находятся в агрегированной форме (также называемой высокомолекулярной – ВМ – формой), обнаруживаемой в композиции после хранения в течение определенного количества времени при конкретной температуре. В конкретных вариантах осуществления приемлемая степень стабильности означает, что не более примерно 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител могут быть обнаружены в агрегированной форме в композиции после хранения в течение определенного количества времени при конкретной температуре. Определенное количество времени, после которого измеряют стабильность, может составлять по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца, или более. Температура, при которой можно хранить фармацевтическую композицию при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от примерно -80°C до примерно 45°C , например, хранение при примерно -80°C , примерно -30°C , примерно -20°C , примерно 0°C , примерно 4°C – 8°C , примерно 5°C , примерно 25°C , примерно 35°C , примерно 37°C или примерно 45°C . Например, фармацевтическую композицию можно считать стабильной, если после 12 месяцев хранения при 5°C менее примерно 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител обнаружено в агрегированной форме. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после трех месяцев хранения при 25°C менее примерно 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител обнаружено в агрегированной форме. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 28 дней хранения при 45°C менее примерно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% антител обнаружено в агрегированной форме. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после трех месяцев хранения при -20°C , -30°C или -80°C менее примерно 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител обнаружено в агрегированной форме.

[085] Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентной доли антител, которые мигрируют в более кислой фракции при ионообменной хроматографии («кислая форма»), относительно основной фракции антител («основная

заряженная форма»), при этом стабильность обратно пропорциональна фракции антител в кислой форме. Без связи с конкретной теорией, дезамидирование антитела может приводить к тому, что антитело становится более отрицательно заряженным, и, таким образом, более кислым, относительно не дезамидированного антитела (смотри, например, Robinson, N., Protein Deamidation, PNAS, April 16, 2002, 99(8):5283–5288). Процентную долю «закисленных» антител можно определять, в частности, методом ионообменной хроматографии (например, катионообменной сверхэффективной жидкостной хроматографии [КО–СЭЖХ]). Используемое в настоящем документе выражение «приемлемая степень стабильности» означает, что не более 45% антител находятся в более кислой форме, обнаруживаемой в композиции после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре. В конкретных вариантах осуществления приемлемая степень стабильности означает, что не более примерно 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител может быть обнаружено в кислой форме в композиции после хранения в течение определенного количества времени при конкретной температуре. В одном варианте осуществления приемлемая степень стабильности означает, что менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител может быть обнаружено в кислой форме в композиции после хранения в течение определенного количества времени при конкретной температуре. Определенное количество времени, после которого измеряют стабильность, может составлять по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца, или более. Температура, при которой можно хранить фармацевтическую композицию при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от примерно -80°C до примерно 45°C , например, хранение при примерно -80°C , примерно -30°C , примерно -20°C , примерно 0°C , примерно 4°C – 8°C , примерно 5°C , примерно 25°C или примерно 45°C . Например, фармацевтическую композицию можно считать стабильной, если после трех месяцев хранения при -80°C , -30°C , или -20°C менее примерно 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител находятся в более кислой форме. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после шести месяцев хранения при 5°C менее примерно 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител находятся в более кислой форме. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после шести месяцев хранения при 25°C менее примерно 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%,

15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител находятся в более кислой форме. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 28 дней хранения при 45°C менее примерно 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антител может быть обнаружено в более кислой форме.

[086] Для оценки стабильности композиций по настоящему изобретению могут быть использованы и другие методы, такие как, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для определения термостабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности, а также поглощение при примерно 350 нм или примерно 405 нм для определения мутности раствора. Например, композицию по настоящему изобретению можно считать стабильной, если после 6 или более месяцев хранения при температуре от примерно 5°C до примерно 25°C изменение OD_{405} композиции составляет менее примерно 0,05 (например, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) от показателя OD_{405} композиции в момент времени ноль.

[087] Измерение биологической активности или аффинности связывания антитела с его мишенью также можно использовать для оценки стабильности. Например, композицию по настоящему изобретению можно считать стабильной, если после хранения при, например, 5°C, 25°C, 45°C, и так далее, в течение определенного количества времени (например, от 1 до 12 месяцев) анти-PD-1 антитело, содержащееся в композиции, связывает PD-1 с аффинностью, которая составляет по меньшей мере 90%, 95% или более от аффинности связывания антитела до указанного хранения. Аффинность связывания можно определять, например, методом ELISA или поверхностного плазмонного резонанса. Биологическую активность можно определять в анализе активности PD-1, например, путем создания контакта клетки, экспрессирующей PD-1, с композицией, содержащей анти-PD-1 антитело. Связывание антитела с такой клеткой можно измерять непосредственно, например, в FACS-анализе. Альтернативно, последующую активность системы PD-1 можно измерять в присутствии антитела и сравнивать с активностью системы PD-1 в отсутствие антитела. В некоторых вариантах осуществления PD-1 может быть эндогенным для клетки. В других вариантах осуществления PD-1 может эктопически экспрессироваться в клетке.

[088] Дополнительные методы оценки стабильности антитела в композиции продемонстрированы в приведенных ниже примерах.

[089] В конкретных вариантах осуществления жидкие фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут проявлять низкие или умеренные уровни вязкости. Используемый в настоящем документе термин «вязкость» может означать «кинематическую вязкость» или «абсолютную вязкость». «Кинематическая вязкость» является мерой резистивного потока жидкости под влиянием гравитации. Когда две жидкости с одинаковым объемом помещают в идентичные капиллярные вискозиметры и

позволяют им стекать под действием гравитации, вязкая жидкость дольше, чем менее вязкая жидкость, протекает через капилляры. Например, если одной жидкости требуется 200 секунд для полного протекания, а другой жидкости требуется 400 секунд, то вторая жидкость в два раза более вязкая, чем первая, по шкале кинематической вязкости. «Абсолютная вязкость», иногда называемая динамической или простой вязкостью, является произведением при умножении кинематической вязкости на плотность жидкости (абсолютная вязкость=кинематическая вязкость \times плотность). Размерностью кинематической вязкости является L^2/T , где L означает длину и T означает время. Как правило, кинематическую вязкость выражают в сантистоксах (сСт). Единицей кинематической вязкости в системе Си является $\text{мм}^2/\text{с}$, что соответствует 1 сСт. Абсолютную вязкость выражают в единицах, называемых сантипуазами (сП). Единицей абсолютной вязкости в системе Си является миллиПаскаль–секунда (мПа–с), где 1 сП=1 мПа–с.

[090] В настоящем документе низкий уровень вязкости, применительно к жидкой композиции по настоящему изобретению, будет означать абсолютную вязкость менее примерно 20 сантипуаз (сП). Например, жидкую композицию по изобретению считают имеющей «низкую вязкость», если при измерении стандартными методами измерения вязкости композиция имеет абсолютную вязкость примерно 20 сП, примерно 19 сП, примерно 18 сП, примерно 15 сП, примерно 12 сП, примерно 10 сП, примерно 9 сП, примерно 8 сП или менее. В настоящем документе умеренный уровень вязкости, применительно к жидкой композиции по настоящему изобретению, будет означать абсолютную вязкость от примерно 35 сП до примерно 20 сП. Например, жидкую композицию по изобретению считают имеющей «умеренную вязкость», если при измерении стандартными методами измерения вязкости композиция имеет абсолютную вязкость примерно 34 сП, примерно 33 сП, примерно 32 сП, примерно 31 сП, примерно 30 сП, примерно 29 сП, примерно 28 сП, примерно 27 сП, примерно 26 сП, примерно 25 сП, примерно 24 сП, примерно 23 сП, примерно 22 сП, примерно 21 сП, примерно 20 сП, примерно 19 сП, 18 сП, примерно 17 сП, примерно 16 сП или примерно 15,1 сП.

[091] Как проиллюстрировано в приведенных ниже примерах, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что низковязкие жидкие композиции, содержащие в высокой концентрации (например, от примерно 50 мг/мл вплоть до 250 мг/мл) антитело против PD-1 человека, могут быть получены путем формулирования антитела с пролином в концентрации от примерно 1% до примерно 5% и сахарозой в концентрации примерно 5%. Такие композиции устойчивы к стрессу при обработке и при хранении в диапазоне температур от 45°C до –80°C (показано в настоящем документе), а также имеют низкую вязкость (имеют вязкость в диапазоне от 7 до 15 сП).

Иллюстративные композиции

[092] В одном аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция представляет собой стабильную, низковязкую, как правило, физиологически изотоническую жидкую композицию, содержащую: (i) человеческое антитело, которое

специфически связывает PD-1 человека (например, H4H7798N), в концентрации вплоть до 250 мг/мл \pm 45 мг/мл; (ii) гистидиновую буферную систему, обеспечивающую достаточные буферные свойства при примерно pH 6,0 \pm 0,3; (iii) органический соразтворитель, который защищает структурную целостность антитела; (iv) тепловой стабилизатор, представляющий собой сахар; и (v) модификатор вязкости, представляющий собой аминокислоту, который служит для поддержания вязкости на уровне, подходящем для инъекции, в удобном для подкожного введения объеме.

[093] В одном варианте осуществления стабильная, низковязкая фармацевтическая композиция содержит: (i) человеческое IgG4 антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, и которое содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в концентрации вплоть до 200 мг/мл \pm 30 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер в концентрации 10 мМ \pm 2 мМ, проявляющий буферные свойства при pH 6,0 \pm 0,3; (iii) полисорбат 80 в концентрации 0,2% масс/об \pm 0,1% масс/об; (iv) сахарозу в концентрации 5% \pm 1% масс/об и (v) L-пролин в концентрации 1,5% (масс/об) \pm 0,3%.

[094] В одном варианте осуществления стабильная, низковязкая фармацевтическая композиция содержит: (i) человеческое IgG4 антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, и которое содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в концентрации 175 мг/мл \pm 26,25 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер в концентрации 10 мМ \pm 2 мМ, проявляющий буферные свойства при pH 6,0 \pm 0,3; (iii) полисорбат 80 в концентрации 0,2% масс/об \pm 0,1% масс/об; (iv) сахарозу в концентрации 5% \pm 1% масс/об и (v) L-пролин в концентрации 1,5% (масс/об) \pm 0,3%.

[095] В одном варианте осуществления стабильная, низковязкая фармацевтическая композиция содержит: (i) человеческое IgG4 антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, и которое содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в концентрации 150 мг/мл \pm 22,5 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер в концентрации 10 мМ \pm 2 мМ, проявляющий буферные свойства при pH 6,0 \pm 0,3; (iii) полисорбат 80 в концентрации 0,2% масс/об \pm 0,1% масс/об; (iv) сахарозу в концентрации 5% \pm 1% масс/об и (v) L-пролин в концентрации 1,5% (масс/об) \pm 0,3%.

[096] В одном варианте осуществления стабильная, низковязкая фармацевтическая композиция содержит: (i) человеческое IgG4 антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, и которое содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в концентрации 100 мг/мл \pm 15 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер в концентрации 10 мМ \pm 2 мМ, проявляющий буферные свойства при pH 6,0 \pm 0,3; (iii) сахарозу в концентрации 5% масс/об \pm 1% масс/об; (iv) полисорбат 80 в концентрации 0,2% масс/об \pm 0,1% и L-пролин в концентрации 1,5% (масс/об) \pm 0,3%.

[097] В одном варианте осуществления стабильная, низковязкая фармацевтическая

композиция содержит: (i) человеческое IgG4 антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, и которое содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в концентрации 50 мг/мл \pm 7,5 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер в концентрации 10 mM \pm 2 mM, проявляющий буферные свойства при pH 6,0 \pm 0,3; (iii) сахарозу в концентрации 5% масс/об \pm 1% масс/об; (iv) полисорбат 80 в концентрации 0,2% масс/об \pm 0,1% и L-пролин в концентрации 1,5% (масс/об) \pm 0,3%.

[098] В одном варианте осуществления стабильная, низковязкая фармацевтическая композиция содержит: (i) человеческое IgG4 антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, и которое содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в концентрации 25 мг/мл \pm 3,75 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер в концентрации 10 mM \pm 2 mM, проявляющий буферные свойства при pH 6,0 \pm 0,3; (iii) сахарозу в концентрации 5% масс/об \pm 1% масс/об; (iv) полисорбат 80 в концентрации 0,2% масс/об \pm 0,1% и L-пролин в концентрации 1,5% (масс/об) \pm 0,3%.

[099] Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтических композиций, охваченных настоящим изобретением, приведены в другом разделе настоящего документа, включая рабочие примеры, приведенные ниже.

Контейнеры и способы введения

[0100] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут находиться в любом контейнере, подходящем для хранения медикаментов и других терапевтических композиций. Например, фармацевтические композиции могут находиться в герметически закрытом и стерилизованном пластиковом или стеклянном контейнере, имеющем определенный объем, таком как флакон, ампула, шприц, картридж или бутылка. Для содержания композиций по настоящему изобретению можно использовать флаконы разных типов, включая, например, прозрачные и непрозрачные (например, янтарного цвета) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогично, шприц любого типа можно использовать для содержания и введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

[0101] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут находиться в шприцах с «нормальным содержанием вольфрама» или шприцах с «низким содержанием вольфрама». Как понятно специалистам в данной области, метод изготовления стеклянных шприцев, как правило, включает использование горячего вольфрамового стержня, функция которого заключается в прокалывании стекла, с созданием отверстия, через которое можно отбирать и выталкивать жидкость из шприца. Этот метод приводит к отложению следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца. Можно использовать последующее промывание и другие этапы обработки для уменьшения количества вольфрама в шприце. Используемый в настоящем документе термин «нормальное содержание вольфрама» означает, что шприц содержит более, или ровно, 500 частей на миллиард (ppb) вольфрама. Термин «низкое содержание

вольфрама» означает, что шприц содержит менее 500 ppb вольфрама. Например, шприц с низким содержанием вольфрама по настоящему изобретению может содержать менее примерно 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, или менее, ppb вольфрама.

[0102] Резиновые поршни, используемые в шприцах, и резиновые крышки, используемые для закрывания отверстий флаконов, могут иметь покрытие для предотвращения загрязнения лекарственного содержимого шприца или флакона, или для сохранения его стабильности. Таким образом, фармацевтические композиции по настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления могут находиться в шприце, который имеет поршень с покрытием, или во флаконе, который закрыт резиновой пробкой с покрытием. Например, поршень или пробка могут иметь покрытие из фторуглеродной пленки. Примеры крышек или поршней с покрытием, подходящих для использования с флаконами и шприцами, содержащими фармацевтические композиции по настоящему изобретению, приведены, например, в патентах США №№ 4997423; 5908686; 6286699; 6645635; и 7226554, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Конкретные иллюстративные резиновые пробки и поршни с покрытием, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, коммерчески доступны под торговым названием «FluroTec[®]» от компании West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA). FluroTec[®] является примером фторуглеродного покрытия, используемого для минимизации или предотвращения прилипания лекарственного продукта к резиновым поверхностям.

[0103] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции могут находиться в шприце с низким содержанием вольфрама, имеющем поршень с фторуглеродным покрытием.

[0104] Фармацевтические композиции можно вводить пациенту парентеральными путями введения, такими как инъекция (например, подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутрибрюшинная и так далее), либо чрескожным, мукозальным, назальным, легочным или пероральным путями введения. Можно использовать различные устройства доставки, такие как шприц–ручки или автоинжекторные устройства доставки многократного применения, для подкожной доставки фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Примеры включают, но без ограничения, AUTOPEN[™] (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц–ручку DISETRONIC[™] (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц–ручку HUMALOG MIX 75/25[™], шприц–ручку HUMALOG[™], шприц–ручку HUMALIN 70/30[™] (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN[™] I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR[™] (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц–ручку BD[™] (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN[™], OPTIPEN PRO[™], OPTIPEN STARLET[™] и OPTICLIK[™] (Sanofi–Aventis, Frankfurt, Germany). Примеры шприц–ручек и автоинжекторных устройств доставки однократного применения, используемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, шприц–ручку

SOLOSTAR™ (Sanofi–Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжекторное устройство SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц–ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL).

[0105] В настоящем документе также предусмотрено использование микроинфузионного устройства для доставки фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин «микроинфузионное устройство» означает устройство для подкожной доставки, сконструированное для медленного введения больших объемов (например, вплоть до примерно 2,5 мл или более) терапевтической композиции в течение продолжительного периода времени (например, примерно 10, 15, 20, 25, 30 или более минут). См. например, U.S. 6629949; US 6659982; а также Meehan et al., J. Controlled Release 46: 107–116 (1996). Микроинфузионные устройства особенно полезны для доставки больших доз терапевтических белков, находящихся в высококонцентрированных (например, примерно 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл) или вязких растворах.

[0106] В конкретных вариантах осуществления стабильная жидкая фармацевтическая композиция жидкая фармацевтическая композиция по любому из предшествующих аспектов находится в стерильном стеклянном флаконе, и ее вводят в/в инфузией.

[0107] В одном варианте осуществления контейнер представляет собой 20–мл флакон из прозрачного боросиликатного стекла типа 1. В конкретных вариантах осуществления контейнер представляет собой 2–мл, 5–мл или 10–мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®.

[0108] В одном варианте осуществления жидкая фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащий примерно 25 мг/мл или 50 мг/мл мАт1, вводят внутривенно, и он может находиться в стеклянном флаконе.

[0109] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к автоинжекторному устройству, содержащему любой из жидких композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к автоинжекторному устройству, содержащему стабильная жидкая композиция, содержащий примерно 50 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 150 мг/мл или примерно 175 мг/мл мАт1, примерно 10 мМ гистидина, при рН примерно 6,0, примерно 5% сахарозы, примерно 1,5% пролина и примерно 0,2% полисорбата 80.

[0110] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к предварительно заполненному шприцу, содержащему любой из жидких композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к предварительно заполненному шприцу, содержащему стабильная жидкая композиция, содержащий примерно 50 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 150 мг/мл или примерно 175 мг/мл мАт1, примерно 10 мМ гистидина, при рН примерно 6,0, примерно 5% сахарозы, примерно 1,5% пролина и примерно 0,2% полисорбата 80. В

конкретных вариантах осуществления шприц представляет собой 1–мл или 2,25–мл стеклянный шприц, оснащенный тонкостенной иглой 27 калибра, резиновым поршнем с фторуглеродным покрытием и резиновым предохранительным колпачком для иглы.

[0111] В одном варианте осуществления жидкая фармацевтическая композиция, содержащий примерно 175 мг/мл \pm 26,25 мг/мл мАт1, вводят в объеме вплоть до примерно 2 мл при помощи предварительно заполненного шприца. В конкретных вариантах осуществления шприц представляет собой 1–мл или 2,25–мл стеклянный шприц, оснащенный тонкостенной иглой 27 калибра, резиновым поршнем с фторуглеродным покрытием и резиновым предохранительным колпачком для иглы. В одном варианте осуществления шприц представляет собой 1–мл стеклянный шприц OMP1, оснащенный иглой 27 калибра, резиновым предохранительным колпачком для иглы FM27 и резиновым поршнем 4023/50 с покрытием FLUROTEC®.

[0112] В одном варианте осуществления жидкая фармацевтическая композиция, содержащий примерно 150 мг/мл \pm 22,5 мг/мл анти–PD–1 антитела, вводят в объеме вплоть до примерно 2 мл при помощи предварительно заполненного шприца. В одном варианте осуществления шприц представляет собой 1–мл или 2,25–мл стеклянный шприц, оснащенный тонкостенной иглой 27 калибра, резиновым поршнем с фторуглеродным покрытием и резиновым предохранительным колпачком для иглы. В одном варианте осуществления шприц представляет собой 1–мл стеклянный шприц OMP1, оснащенный иглой 27 калибра, резиновым предохранительным колпачком для иглы FM27 и резиновым поршнем 4023/50 с покрытием FLUROTEC®.

Терапевтическое применение фармацевтических композиций

[0113] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются полезными, в частности, для лечения, предотвращения или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного активностью PD–1, включая заболевания или нарушения, опосредованные PD–1. Иллюстративные, неограничивающие заболевания и нарушения, которые можно лечить или предотвращать путем введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению, включают вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания и различные виды рака, например, рак мозга, рак легкого, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак кожи, различные формы рака клеток крови и рак эндометрия.

ПРИМЕРЫ

[0114] Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области полной информации и описания того, как осуществлять и применять способы и композиции по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы заявки считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых показателей (например, количества, температуры и так далее), однако следует учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если нет иных указаний, части представляют собой части в молярном выражении, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу,

температура выражена в градусах Цельсия, и давление соответствует, или примерно соответствует, атмосферному давлению.

Пример 1: Разработка композиции анти-PD-1 антитела

[0115] Цель заключалась в разработке композиции, обладающей следующими качествами:

- Жидкая композиция с концентрацией анти-PD-1 антитела, достаточной для доставки дозы 250 мг, или более, внутривенной инфузией;
- Примерно изоосмолярная композиция, стабильная при разбавлении обычно используемыми разбавителями, например, 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций или 5% раствором декстрозы для инъекций, предназначенный для внутривенной инфузии;
- Композиция, совместимая с, и стабильная в прозрачном стеклянном флаконе типа 1 со стандартной пробкой для сыворотки в качестве упаковки; и
- Стерильный раствор лекарственного продукта (ЛП), обеспечивающий долговременную стабильность;
 - Композиция, обеспечивающая минимальное образование высокомолекулярных (ВМ) вариантов антитела при подвергании обработке и тепловому стрессу;
 - Композиция, обеспечивающая минимальные изменения в относительном распределении заряженных вариантов антитела при тепловом стрессе; и
 - Композиция, сохраняющая биологическую активность при подвергании обработке и тепловому стрессу.

[0116] В процессе разработки композиции были использованы три основных стрессовых условия для белка (представляющие экстремальные условия обработки, за пределами которых лекарственный продукт антитела не будет подвергнут воздействию во время обработки, производства, транспортировки, хранения и маркировки) с целью разработки и оптимизации композиций антитела и для оценки эффектов потенциальных реальных стрессов на стабильность лекарственного продукта. Эти стрессовые условия включали:

- Перемешивание (на вихревой мешалке) раствора белка при комнатной температуре. Перемешивание на вихревой мешалке в стеклянных флаконах является более интенсивным, чем перемешивание, которое имеет место при обработке и производстве белка.
- Инкубацию раствора белка при температуре, повышенной (37°C, 40°C или 45°C) в сравнении с предполагаемыми условиями хранения композиции ЛП (2°C – 8°C).
- Подвергание белка нескольким циклам замораживания–размораживания. Поскольку белок будет подвергаться по меньшей мере одному циклу замораживания–размораживания в процессе производства ЛП, несколько циклов замораживания–размораживания имитируют и превосходят фактический стресс, которому, как ожидается, будет подвергнут белок.

[0117] Четыре основные задачи были поставлены при разработке исходной

композиции:

1. Выбор буфера и рН: выбор буфера и рН может оказывать большое влияние на стабильность белков, вследствие этого, выбор оптимального вида буфера и рН является важным процессом. В данных разделах описаны исследования, демонстрирующие логическое обоснование для выбора оптимального буфера и рН для антитела.

2. Выбор сурфактанта или органического сорастворителя: сурфактант или органический сорастворитель, такой как полисорбат, как правило, необходим для предотвращения преципитации или агрегации белков при перемешивании. Растворимый белок может быть подвергнут перемешиванию при обработке, фильтровании, смешивании, производстве, транспортировке и введении. Лекарственная субстанция антитела в простом буферном растворе может становиться визуально мутной при избыточном перемешивании. Таким образом, было решено, что стабилизация белка при обработке и перемешивании является важной.

3. Идентификация/выбор стабилизирующих/поддерживающих тоничность эксципиентов: добавление сахаров, солей и аминокислот изучали в отношении повышения устойчивости антитела к тепловому стрессу и увеличения срока хранения композиции ЛП. В настоящем документе приведено логическое обоснование для включения этих тепловых стабилизаторов, а также описаны исследования по выяснению оптимальных концентраций в конечной композиции.

4. Выбор концентрации антитела: было изучено влияние концентрации антитела на стабильность лекарственного продукта с выбранными эксципиентами.

[0118] Разработку исходной композиции проводили с использованием анти-PD-1 антитела в концентрации 5–50 мг/мл и проведением скрининга органических сорастворителей, тепловых стабилизаторов и буферов в жидких композициях анти-PD-1 антитела для определения эксципиентов, которые совместимы с белком и повышают его стабильность, при этом сохраняя примерно физиологическую осмоляльность и низкую вязкость для внутривенной и подкожной инъекции. Также изучали буферы с целью определения оптимального рН для максимальной стабильности белка (описано в примерах 4, 6 и 7 настоящего документа).

[0119] Результаты этой разработки исходной композиции были использованы для разработки исходной композиции, подходящей для фазы 1 клинических исследований. Композиция фазы 1 также является эталонной композицией при оптимизации композиций для более поздней фазы клинических исследований и коммерческих композиций.

[0120] На основании информации, полученной при разработке исходной композиции, разработка композиции для более поздней стадии клинических исследований включала оптимизацию рН, концентрации сурфактантов и стабилизаторов с целью определения эксципиентов, повышающих стабильность белка как при низких, так и при высоких, концентрациях белка (вплоть до 175 мг/мл мАт1) (описано в примерах 5, 8, 9 и 10).

[0121] В процессе разработки композиции оценивали на стабильность при стрессе

и при хранении. Способы, используемые для оценки стабильности в исследованиях по разработке композиции, описаны в примере 3 настоящего документа. В примерах 11 и 12 описано изучение стабильности композиций при хранении и стрессе.

[0122] В примере 13 описано изучение стабильности композиций при варьировании эксципиентов в определенных диапазонах.

[0123] Результаты, полученные в данных исследованиях, были использованы для разработки стабильных жидких композиций, подходящих для клинического применения, как для внутривенного (в/в), так и для подкожного (п/к), введения. В примере 14 описаны контейнеры, используемые для композиций по настоящему изобретению. В примерах 15, 16 и 17 описаны исследования совместимости и стабильности композиций в стеклянных флаконах, предварительно заполненных шприцах и устройствах для внутривенной доставки. Такие композиции отвечают целям, определенным для разработки композиции:

- Разработанные композиции подходят для разработанных доз;
- Тоничность является изоосмолярной с физиологическими условиями;
 - Осмоляльность композиции с концентрацией 50 мг/мл составляет примерно 318 мОсм/кг;
- Стерильный раствор ЛП поддерживает долгосрочную стабильность в жидком состоянии;
 - При долгосрочном хранении в условиях 2–8°C происходит минимальное образование ВМ вариантов антитела;
 - При долгосрочном хранении в условиях 2–8°C происходит минимальное, или не происходит, изменение распределения заряженных вариантов антитела; и
 - Минимальное образование не видимых невооруженным глазом частиц имело место в композиции ЛП антитела при хранении с ускоренной деградацией и стресса, а также при хранении в условиях 5°C в течение 12 месяцев.

[0124] Другие признаки композиций станут очевидными из описания, приведенного в настоящем документе.

Анти-PD-1 антитела: Анти-PD-1 антитела описаны в US20150203579, полное содержание которого включено в настоящий документ. Иллюстративным антителом, используемым в приведенных ниже примерах, является полностью человеческое анти-PD-1 антитело H4H7798N (раскрытое в US20150203579, известное как «REGN2810» или «цемиплимаб»), содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащих SEQ ID NO: 1/2; и последовательности CDR тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 3–8; которое в настоящем документе называют «mAt1».

Пример 2: Иллюстративные композиции

[0125] В конкретных вариантах осуществления mAt1 сформулировано в виде водной буферной композиции, содержащей от 5 мг/мл ± 0,75 мг/мл до 250 мг/мл ± 45,0 мг/мл mAt1, 10 mM ± 2 mM гистидинового буфера, 0,2% ± 0,1% масс/об полисорбата, от

1% ± 0,2% до 10% ± 2% масс/об сахарозы и от 1% ± 0,02% до 5% ± 1% масс/об пролина, при рН 6,0 ± 0,3.

[0126] Иллюстративные композиции включают:

- Стабильную низковязкую фармацевтическую композицию, содержащую: 25 мг/мл ± 3,75 мг/мл мАт1, 10 ± 2 мМ гистидинового буфера, 0,2% ± 0,1% масс/об полисорбата 80, 5% ± 1% масс/об сахарозы и 1,5% ± 0,3% масс/об L–пролина, при рН 6,0 ± 0,3.

- Стабильную низковязкую фармацевтическую композицию, содержащую: 50 мг/мл ± 7,5 мг/мл мАт1, 10 ± 2 мМ гистидинового буфера, 0,2% ± 0,1% масс/об полисорбата 80, 5% ± 1% масс/об сахарозы и 1,5% ± 0,3% масс/об L–пролина, при рН 6,0 ± 0,3.

- Стабильную низковязкую фармацевтическую композицию, содержащую: 150 ± 23 мг/мл мАт1, 10 ± 2 мМ гистидинового буфера, 0,2% ± 0,1% масс/об полисорбата 80, 5% ± 1% масс/об сахарозы и 1,5% ± 0,3% масс/об L–пролина, при рН 6,0 ± 0,3.

- Стабильную низковязкую фармацевтическую композицию, содержащую: 175 ± 27 мг/мл мАт1, 10 ± 2 мМ гистидинового буфера, 0,2% ± 0,1% масс/об полисорбата 80, 5% ± 1% масс/об сахарозы и 1,5% ± 0,3% масс/об L–пролина, при рН 6,0 ± 0,3.

Пример 3: Методы, используемые для оценки стабильности композиций

[0127] Использовали следующие анализы для оценки стабильности композиции:

- Цвет и внешний вид при визуальной инспекции
- рН
- Мутность, измеряемая по увеличению OD при 405 нм или методом нефелометрии
- Анализ микрочастиц, выполняемый методом визуализации микропотока (ВМП) (результаты представлены в виде количества частиц, полученного в реальных условиях) и счетно–фотометрическим методом (НІАС)

- Концентрация белка, определяемая методом обращенно–фазовой сверхэффективной жидкостной хроматографии (ОФ–СЭЖХ)

- Чистота, определяемая методом эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ–СЭЖХ) или методом капиллярного электрофореза с микрофлюидными чип–анализаторами в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях с додецилсульфатом натрия (МКЭ–SDS) ПААГ

- Анализ заряженных вариантов, выполняемый методом катионообменной хроматографии–сверхэффективной жидкостной хроматографии (КО–СЭЖХ) или методом динамического капиллярного изоэлектрофокусирования (ДКИЭФ)

- Активность в биологическом анализе: Относительную активность каждого образца определяют с использованием биологического анализа и выражают следующим образом: (IC₅₀ эталонного образца/IC₅₀ образца) * 100%. Измеренная активность образцов, изучаемых в отношении стабильности при хранении, должна находиться в пределах от 50% до 150% от измеренной активности эталонного стандарта.

[0128] Физическую стабильность композиции определяют на основании таких

свойств, как цвет, внешний вид, рН, мутность и концентрация белка. Наличие видимых частиц в растворе можно определять путем визуальной инспекции. Раствор считают прошедшим визуальную инспекцию, если он прозрачный или слегка непрозрачный, практически не содержит видимые частицы и является бесцветным или бледно-желтым. Кроме того, мутность, измеряемую на основании OD при 405 нм, также можно использовать для обнаружения частиц в растворе. Увеличение OD при 405 нм может указывать на присутствие частиц, увеличение непрозрачности или изменение цвета тестируемых композиций. ВМП используют для определения не видимых невооруженным глазом частиц, размер которых ≥ 2 мкм. Концентрацию белка мАт1 измеряют методом ОФ–СЭЖХ и выражают в виде процентной доли извлеченного белка относительно исходного материала. В анализе методом ОФ–СЭЖХ мАт1 элюируют с колонки с ОФ в виде одного пика. Концентрацию белка определяют на основании общей площади пика мАт1 путем сравнения ее с калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов мАт1. Процент извлечения рассчитывают на основании измеренной концентрации белка относительно исходной концентрации белка.

[0129] Химическую стабильность определяют на основании образования ковалентно модифицированных форм (например, ковалентных агрегатов, продуктов расщепления или заряженных вариантов) и нековалентно модифицированных форм (например, нековалентных агрегатов) белка. Продукты с более высокой, а также более низкой в результате деградации, молекулярной массой могут быть отделены от нативного мАт1 методами ЭХ–СЭЖХ и МКЭ–SDS. Процентную долю деградированного мАт1 в анализах методами ЭХ–СЭЖХ и МКЭ–SDS рассчитывают на основании отношения площади всех пиков не нативного белка к общей площади всех пиков мАт1. Заряженные варианты мАт1 определяют методами КО–СЭЖХ и дКИЭФ. В методе КО–СЭЖХ пики, имеющие время удержания менее, чем у основного пика, считают пиками «кислых» форм; пики, имеющие время удержания более, чем у основного пика, считают пиками «щелочных» форм. В методе дКИЭФ пики, которые фокусируются до более низкого рI, чем у основного пика, считают пиками «кислых» форм, при этом пики, которые фокусируются до более высокого рI, чем у основного пика, считают пиками «щелочных» форм.

Пример 4: Эффект различных буферов и рН

[0130] Эффект буфера и рН на термостабильность мАт1 в жидких композициях изучали путем инкубации 5 мг/мл раствора мАт1 при 45°C в течение 28 дней в серии буферных систем в разных диапазонах рН. Изучали следующие значения рН и буферные системы: ацетат (рН 4,5, 5,0, 5,5), гистидин (рН 5,5, 6,0, 6,5) и фосфат (рН 6,0, 6,5, 7,0). На основании результатов анализа ЭХ–СЭЖХ максимальную стабильность белка наблюдали, когда мАт1 было сформулировано при рН 6,0–6,5 в гистидиновом буфере (Таблица 1).

Таблица 1: Эффект буфера и рН на стабильность 5 мг/мл раствора мАт1, инкубированного при 45°C в течение 28 дней

Композиция	5 мг/мл мАт1, 10 мМ буфер
------------	---------------------------

Объем заполнения	0,4 мл								
Контейнер	2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутылкаучука, покрытой FluroTec®								
рН/Буфер	Цвет и внешний вид	Мутность (увеличение OD при 405 нм)	Извлеченного % белка, ОФ-	Изменение чистоты, ЭХ- СЭЖХ ^{a)}			Изменение заряженных вариантов, КО-СЭЖХ ^{a)}		
				% ВМ	% Нативно го	% НМ	% Кислы х	% Основн ых	% Щелочн ых
рН 4,5, Ацетат	Годен	0,00	87	5,2	-7,2	2,0	11,1	-15,4	4,3
рН 5,0, Ацетат	Годен	0,00	82	5,0	-5,9	0,9	7,5	-10,9	3,4
рН 5,5, Ацетат	Годен	0,00	90	4,7	-5,4	0,7	12,8	-13,7	0,9
рН 5,5, Гистидин	Годен	0,00	97	5,6	-6,4	0,8	10,8	-12,4	1,6
рН 6,0, Гистидин	Годен	0,00	86	1,9	-2,4	0,6	13,4	-12,6	-0,7
рН 6,5, Гистидин	Годен	0,00	84	1,2	-1,8	0,7	25,4	-21,3	-4,1
рН 6,0, Фосфат	Годен	0,01	92	3,7	-4,3	0,6	24,8	-21,8	-3,0
рН 6,5, Фосфат	Годен	0,03	91	4,9	-5,8	0,9	49,6	-40,3	-9,3
рН 7,0, Фосфат	Годен	0,03	95	10,4	-11,6	1,2	56,5	-42,2	-14,3

^{a)}Представлено в виде относительного изменения чистоты в сравнении с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 97,2\%$ в пике нативного белка при определении методом ЭХ-СЭЖХ и $\geq 49,0\%$ в основном пике при определении методом КО-СЭЖХ, во всех композициях.

КО=катионообменная (хроматография); ЛС=лекарственная субстанция; ВМ=высокомолекулярные; НМ=низкомолекулярные; OD=оптическая плотность; ОФ=обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ=эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ=сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0131] На основании результатов анализа методом КО-СЭЖХ максимальную стабильность белка наблюдали, когда мАт1 было сформулировано при рН 5,5–6,0 в гистидиновом буфере или при рН 5,0–5,5 в ацетатном буфере. Данные анализы также показали, что агрегация (то есть, образование ВМ вариантов), фрагментация (то есть, образование НМ вариантов) и образование заряженных вариантов являлись основными путями деградации. Гистидиновый буфер был выбран в качестве буфера композиции, поскольку он обеспечивает, в целом, наилучший уровень стабилизации белка с точки зрения образования ВМ и НМ вариантов и образования заряженных вариантов. рН 6,0 был выбран для композиции, поскольку образование ВМ вариантов и образование заряженных вариантов, представляющие собой основные пути деградации, были минимальными при данном значении рН. На основании этих результатов 10 мМ гистидиновый буфер с рН 6,0 был выбран для композиции мАт1.

Пример 5: Скрининг рН в гистидиновых буферах

[0132] Эффект буфера и рН на термостабильность МАТ1 изучали в высококонцентрированных жидких композициях. 150 мг/мл раствор МАТ1 инкубировали при 45°C в течение 28 дней в серии гистидиновых буферов с диапазоном рН 5,3, 5,5, 5,8, 6,0 и 6,3, с добавлением и без добавления тепловых стабилизаторов. На основании результатов анализа ЭХ–СЭЖХ, при использовании 9% сахарозы, максимальную стабильность белка наблюдали, когда МАТ1 было сформулировано при рН 5,8–6,3 в гистидиновом буфере (Фигура 1). На основании результатов анализа КО–СЭЖХ максимальную стабильность белка наблюдали, когда МАТ1 было сформулировано при рН 5,3–6,0 в гистидиновом буфере (Таблица 2).

Таблица 2: Эффект рН на стабильность 150 мг/мл раствора МАТ1, инкубированного при 45°C в течение 28 дней

Композиция		150 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин							
Объем заполнения		0,4 мл							
Контейнер/Крышка		2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутилкаучука, покрытой FluroTec®							
рН/ Стабилизатор	Цвет и внешний вид	Мутность (Увеличение OD при 405 нм)	% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ	Изменение чистоты, ЭХ–СЭЖХ ^{а)}			Изменение заряженных вариантов, КО–СЭЖХ ^{а)}		
				% ВМ	% Нативного	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
рН 5,3/нет	Не годен ^{б)}	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
рН 5,5/нет	Не годен ^{б)}	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
рН 5,8/нет	Не годен	0,40	95	46,2	–46,4	0,3	6,4	–10,2	3,9
рН 6,0/нет	Не годен	0,51	99	41,2	–41,5	0,3	10,6	–7,3	–3,3
рН 6,3/нет	Не годен	0,65	98	35,0	–35,4	0,4	19,6	–14,3	–5,3
рН 5,3/9% (масс/об) сахароза	Годен	0,14	95	41,9	–42,1	0,3	7,9	–11,1	3,2
рН 5,5/9% (масс/об) сахароза	Годен	0,16	99	30,8	–31,2	0,4	9,5	–12,5	2,9
рН 5,8/9% (масс/об) сахароза	Годен	0,13	100	22,8	–23,3	0,5	9,7	–11,8	2,1
рН 6,0/9% (масс/об) сахароза	Годен	0,14	99	19,4	–19,9	0,5	13,5	–14,5	1,0
рН 6,3/9% (масс/об) сахароза	Годен	0,15	98	16,9	–17,4	0,5	22,4	–22,1	–0,4

^{а)}Представлено в виде относительного изменения чистоты в сравнении с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 94,0\%$ в пике нативного белка при определении методом ЭХ–СЭЖХ и $\geq 48,7\%$ в основном пике при определении методом КО–СЭЖХ, во всех композициях.

^{б)}Образец желированный. Последующие анализы не проводили. Н/П=не применимо.

КО, катионообменная (хроматография); ВМ, высокомолекулярные; НМ, низкомолекулярные; OD, оптическая плотность; ОФ, обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0133] Данные анализы также показали, что агрегация (то есть, образование ВМ вариантов) и образование заряженных вариантов являлись основными путями деградации. рН 6,0 был выбран для композиции ЛП, поскольку образование ВМ вариантов и образование заряженных вариантов, представляющие собой основные пути деградации, были минимальными при данном значении рН. На основании этих результатов 10 мМ гистидиновый буфер с рН 6,0 был выбран для высококонцентрированной композиции ЛП МАТ1.

Пример 6: Выбор защитных средств от стресса, вызываемого перемешиванием

[0134] Стабилизаторы, такие как сурфактанты и органические соразтворители, часто добавляют в композиции антител для защиты белка от вызываемой перемешиванием агрегации. Эффект органических соразтворителей и сурфактантов на стресс, вызываемый перемешиванием, стабильность и термостабильность 5 мг/мл раствора МАТ1 изучали в жидких композициях. Оценивали следующие соразтворители и сурфактанты: 0,1% полисорбата 20, 0,1% полисорбата 80 и 1,0% PEG 3350. Результаты изучения стабильности при стрессе, вызываемом перемешиванием, приведены в Таблице 3.

Таблица 3: Эффект органических соразтворителей и сурфактантов на стабильность 5 мг/мл композиции МАТ1 после перемешивания (120 мин перемешивания на вихревой мешалке)

Композиция	5 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0									
Объем заполнения	0,4 мл									
Контейнер	2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутылкаучука, покрытой FluroTec®									
Соразтворитель/Сурфактант	Цвет и внешний вид	Мутность OD (Увеличение OD при 405 нм)	рН	% Извлеченного белка, ОФ-СЭЖХ	Изменение чистоты, ЭХ-СЭЖХ ^{а)}			Изменение заряженных вариантов, КО-СЭЖХ ^{а)}		
					% ВМ	% Нативно го	% НМ	% Кисл ых	% Основн ых	% Щелочн ых
Без соразтворителя/сурфактанта	Не годен	1,69	6,0	76	15,3	-23,7	-8,4	-2,3	-1,7	3,9
5% (масс/об) сахара	Не годен	1,75	6,0	64	9,4	-12,8	3,4	-1,7	-0,1	1,8
0,1% (масс/об) полисорбат 20	Годен	0,00	6,0	102	-0,1	-0,8	0,8	0,2	0,2	-0,3
0,1%	Годен	0,00	6,0	100	-0,2	-0,5	0,4	0,2	-0,1	-0,1

(масс/об) полисорбат 80 ^{b)}										
1% (масс/об) PEG 3350 ^{b)}	Не годен	0,20	6,0	93	0,3	-0,5	0,2	-0,2	-0,3	0,4

^aПредставлено в виде относительного изменения чистоты в сравнении с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 98,2\%$ в пике нативного белка при определении методом ЭХ–СЭЖХ и $\geq 49,1\%$ в основном пике при определении методом КО–СЭЖХ, во всех 5 композициях.

^bКомпозиция также содержит 5% сахарозы.

КО=катионообменная (хроматография); ВМ=высокомолекулярные; НМ=низкомолекулярные; ОД=оптическая плотность; ОФ=обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ=эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ=сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0135] мАт1 было нестабильно при перемешивании на вихревой мешалке в течение 120 мин в отсутствие органического соразтворителя или сурфактанта. После перемешивания на вихревой мешалке в отсутствие соразтворителя или сурфактанта раствор становился непрозрачным, имело место значительное увеличение мутности и возрастание на 15,3% количества агрегатов при определении методом ЭХ–СЭЖХ, а также на 24% уменьшалось извлечение белка при определении методом ОФ–СЭЖХ (Таблица 3). 1% PEG 3350 не обеспечивал достаточную стабилизацию мАт1 после 120 мин перемешивания на вихревой мешалке. В присутствии 1% PEG 3350 раствор становился непрозрачным и имело место увеличение мутности (Таблица 3). Напротив, и 0,1% полисорбат 20, и 0,1% полисорбат 80, в некоторой степени защищали мАт1 от вызываемой перемешиванием нестабильности (Таблица 3).

[0136] Однако композиция, содержащая 0,1% полисорбата 80, имела меньшее количество агрегатов в сравнении с композицией, содержащей 0,1% полисорбата 20, при инкубации при 45°C (Таблица 4). Полисорбат 80 в концентрации 0,1% был выбран в качестве сурфактанта для ЛП мАт1, поскольку он стабилизирует белок при стрессе, вызываемом перемешиванием, в меньшей степени оказывает негативный эффект на термостабильность белка, чем полисорбат 20 (при определении как методом ЭХ–СЭЖХ, так и КО–СЭЖХ), и имеет историю безопасного использования в композициях моноклональных антител.

Пример 7: Выбор защитного средства от теплового стресса

[0137] Стабилизаторы, такие как сахароза, часто добавляют к композициям антител для повышения термостабильности белка в жидких композициях. мАт1 с концентрацией пять (5) мг/мл в жидкой композиции демонстрировало повышенную стабильность при формулировании с 5% сахарозы и инкубации в условиях ускоренной деградации (Таблица 4).

Таблица 4: Эффект органических соразтворителей и сурфактантов на стабильность 5 мг/мл композиции мАт1, инкубированной при 45°C в течение 29 дней

Композиция	5 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, рН 6,0
Объем	0,4 мл

заполнения										
Контейнер/ Крышка	2–мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутылкаучука, покрытой FluroTec®									
Сорастворитель/ Сурфактант	Цвет и внешний вид плотность (Увеличение OD при 405 нм)	pH	%	Извлеченного белка, ОФ– СЭЖХ	Изменение чистоты, ЭХ–СЭЖХ ^{a)}			Изменение заряженных вариантов, КО–СЭЖХ ^{a)}		
					% ВМ	% Нативного	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
Без сорастворителя/ сурфактанта	Годен	0,00	6,1	96	2,8	–3,2	0,5	10,8	–10,7	–0,2
5% (масс/об) сахароза	Годен	0,01	6,1	99	1,6	–2,0	0,3	12,6	–11,7	–0,9
0,1% (масс/об) полисорбат 20	Годен	0,00	6,0	92	27,6	–28,4	0,7	0,1	–24,0	23,9
0,1% (масс/об) полисорбат 80	Годен	0,00	6,1	96	12,8	–14,1	0,9	4,4	–20,4	15,9
1% (масс/об) PEG 3350	Годен	0,00	6,1	90	8,4	–8,0	–0,4	0,4	–25,0	24,5

^{a)}Представлено в виде относительного изменения чистоты в сравнении с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 98,2\%$ в пике нативного белка при определении методом ЭХ–СЭЖХ и $\geq 49,1\%$ в основном пике при определении методом КО–СЭЖХ, во всех 5 композициях.

^{b)}Композиция также содержит 5% сахарозы.

КО=катионообменная (хроматография); ВМ=высокомолекулярные; НМ=низкомолекулярные; OD=оптическая плотность; ОФ=обращенно–фазовая (хроматография); ЭХ=эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ=сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0138] После инкубации при 45°C в течение 29 дней относительное количество ВМ вариантов было увеличено на 1,7% в композиции, содержащей 5% сахарозы, в сравнении с увеличением на 2,8% в контрольной композиции без сахарозы. Вследствие этого сахароза была выбрана в качестве теплового стабилизатора. Чтобы сделать композицию изотонической и максимально повысить ее термостабильность, в композиции мАТ1 концентрацию сахарозы увеличивали до 10%.

Пример 8: Оптимизация стабилизаторов

[0139] Цель оптимизации тепловых стабилизаторов заключалась в идентификации стабилизирующих компонентов, которые могли бы быть использованы для разработки композиции ЛП, в котором концентрация антитела могла составлять вплоть до 200 мг/мл. Сахароза в концентрации 10% была выбрана для исходной композиции. Было обнаружено, что с 10% сахарозы вязкость мАТ1 составляла примерно 20 сП при 20°C, что считается слишком высоким показателем для композиций на поздней стадии разработки и для коммерческого продукта. Вследствие этого, была необходима модифицированная композиция мАТ1, обладающая как высокой стабильностью, так и низкой вязкостью.

[0140] Сахароза была выбрана в качестве теплового стабилизатора для мАТ1 при разработке композиции с низкой концентрацией. Для разработки композиции с высокой

концентрацией оценивали влияние других концентраций сахарозы и L-пролина на стабильность и вязкость МАТ1 в концентрации 150 и 175 мг/мл при 25°C (Таблица 5) и при 40°C в течение 1 месяца. Образование ВМ вариантов уменьшалось с увеличением концентраций сахарозы, когда композиции инкубировали при 40°C в течение 28 дней. L-пролин в концентрации 3% обеспечивал стабилизацию аналогично 5% сахарозе, и максимальную стабилизацию наблюдали в случае 9% сахарозы.

[0141] Хотя 9% сахароза обеспечивала несколько лучшую стабилизацию, чем 3% L-пролин, она также увеличивала вязкость композиции. Композиция МАТ1 с концентрацией 175 мг/мл, содержащая 9% сахарозы, имеет вязкость 27 сантипуаз, что создает проблемы при производстве и введении композиции. Композиция МАТ1 с концентрацией 175 мг/мл, содержащая 3% пролина, имеет вязкость примерно 20 сантипуаз, что является допустимым при современном процессе производства.

Таблица 5: Ускоренные испытания стабильности высококонцентрированной композиции МАТ1 с тепловыми стабилизаторами при 25°C в течение 1 месяца

Композиция		210 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин рН 6,0								
Объем заполнения		0,8 мл								
Контейнер/Крышка		5-мл поликарбонатный флакон с высланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой								
Экспоненты	Цвет и внешний вид	Увеличение OD при 405	рН	Извлеченного МАТ1, ОФ-СЭЖХ	Чистота, ЭХ-СЭЖХ			Заряженные варианты, КО-СЭЖХ		
					% ВМ	% Нативного	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
Исходный материал ^{а)}	Годе н	0,00	6,0	100	2,9	96,6	0,5	25,3	47,4	27,3
3% пролин	Годе н	0,01	6,0	106	4,1	95,3	0,6	25,2	47,1	27,8
3% сахароза	Годе н	0,00	6,0	107	4,7	94,8	0,6	25,2	46,5	28,3
5% сахароза	Годе н	0,00	6,0	104	4,7	94,8	0,6	25,1	46,1	28,8
Композиция		FDS/ЛП: 150 мг/мл или 175 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин рН 6,0, 0,1% ПС 80								
Объем заполнения		0,4 мл								
Контейнер/Крышка		2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутилкаучука, покрытой FluroTec [®]								
Исходный материал ^{а)}	Годе н	0,00	6,1	100	2,3	97,4	0,4	24,9	50,2	24,9
9% сахароза, 0,1% ПС 80	Годе н	0,00	6,1	101	3,7	95,7	0,7	28,4	47,7	23,9
3% пролин, 0,1% ПС 80	Годе н	0,00	6,1	101	3,7	95,7	0,7	26,5	47,7	25,8

^{а)}Результаты рН, ЭХ-СЭЖХ и КО-СЭЖХ для «исходного материала» представляют собой средние показатели исходных композиций

[0142] Однако на основании показателей стабильности при хранении при -20°C, -30°C и -80°C было установлено, что композиция с 3% пролином не была такой стабильной, как композиции с сахарозой (Фигура 2). Как показано на Фигуре 2,

композиция F3 (с 5% сахарозой) была стабильна при -20°C , -30°C и -80°C , с $\leq 3\%$ ВМ вариантов.

[0143] Эффект L–пролина на стабилизацию мАт1 изучали на композиции с концентрацией 50 мг/мл. После инкубации при 45°C в течение 28 дней композиция с L–пролином имела более низкие уровни ВМ вариантов, чем композиция без L–пролина, это свидетельствовало о том, что L–пролин стабилизирует антитело в концентрации 50 мг/мл (Таблица 6). Кроме того, изучали влияние L–пролина на белковую структуру антитела биофизическими методами (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье, спектроскопия кругового дихроизма, флуоресцентная эмиссионная спектроскопия и дифференциальная сканирующая калориметрия). Результаты показали, что L–пролин не изменяет вторичную и третичную структуру антитела.

Таблица 6: Эффект стабилизаторов на стабильность 50 мг/мл композиции мАт1 после инкубации при 45°C в течение 28 дней

Композиция		50 мг/мл мАт1, 10 мМ L–гистидин, 5% сахароза, рН 6,0, 0,2% полисорбат 80								
Объем заполнения		0,6 мл								
Контейнер/Крышка		2–мл стеклянный флакон типа 1 с пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec [®]								
Стабилизатор (% масс/об)	Цвет и внешний вид	Мутность (увеличение OD при 405)	рН	Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ	Изменение чистоты, ЭХ–СЭЖХ ^а			Изменение заряженных вариантов, КО–СЭЖХ ^а		
					% ВМ	% Мономера	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
–	Годен	0,02	6,0	96	12,1	–12,7	0,6	10,8	–11,9	1,0
1,5% L–пролин	Годен	0,02	6,1	96	11,3	–11,9	0,6	11,0	–11,8	0,8
3,0% L–пролин	Годен	0,01	6,0	96	10,9	–11,5	0,6	12,8	–12,9	0,1

^аПредставлено в виде изменения чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 98,5\%$ в пике мономера при определении методом ЭХ–СЭЖХ и $\geq 52,8\%$ в основном пике при определении методом КО–СЭЖХ, во всех трех композициях.

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; НМ, низкомолекулярные; OD, оптическая плотность; ОФ, обращенно–фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0144] Эффект разных стабилизаторов на термостабильность мАт1 в высоких концентрациях (150 и 175 мг/мл) дополнительно исследовали в жидких композициях. Оцениваемыми стабилизаторами были 9% (масс/об) сахароза, 3% (масс/об) L–пролин и 5% (масс/об) сахароза с 1,5% (масс/об) L–пролином. Результаты ускоренного исследования стабильности приведены в Таблице 7.

Таблица 7: Эффект стабилизаторов на стабильность мАт1 после инкубации при 25°C и 40°C

Композиция	150 или 175 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 0,1% полисорбат 80
------------	--

Объем заполнения		0,5 мл									
Контейнер/Крышка		2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутилкаучука, покрытой FluroTec®									
Инкубация		25°C в течение 3 месяцев									
Стабилизатор (% масс/об)	Конц. МАТ1 (мг/мл)	Цвет и внешний вид	Мутность (Увеличение OD при 405)	рН	Извлеченного белка, ОФ, %	Изменение чистоты, ЭХ-СЭЖХ ^{a)}			Изменение заряженных вариантов, КО-СЭЖХ ^{a)}		
						% ВМ	% Нативного	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
9% сахара	150	Годен	0,02	6,2	110	2,6	-2,8	0,2	6,0	-4,2	-1,9
3% L-пролин	175	Годен	0,00	6,2	112	2,4	-2,5	0,2	6,5	-4,1	-2,4
5% сахара, 1,5% L-пролин	175	Годен	0,00	6,2	110	2,3	-2,6	0,2	6,0	-3,7	-2,4
Инкубация		40°C в течение 28 дней									
Стабилизатор (% масс/об)	Конц. МАТ1 (мг/мл)	Цвет и внешний вид	Мутность (Увеличение OD при 405)	рН	Извлеченного белка, ОФ, %	Изменение чистоты, ЭХ-СЭЖХ ^{a)}			Изменение заряженных вариантов, КО-СЭЖХ ^{a)}		
						% ВМ	% Нативного	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
9% сахара	150	Годен	0,04	6,1	102	6,9	-7,5	0,5	9,4	-9,7	0,3
3% L-пролин	175	Годен	0,03	6,2	103	11,7	-12,3	0,6	12,1	-10,7	-1,4
5% сахара, 1,5% L-пролин	175	Годен	0,03	6,1	103	8,8	-9,4	0,7	11,4	-10,2	-1,2

^{a)}Представлено в виде изменения чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 97,3\%$ в пике нативного белка при определении методом ЭХ-СЭЖХ и $\geq 49,6\%$ в основном пике при определении методом КО-СЭЖХ, во всех трех композициях.

КО, катионообменная (хроматография); ВМ, высокомолекулярные; НМ, низкомолекулярные; OD, оптическая плотность; ОФ, обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0145] После инкубации при 40°C в течение 28 дней 9% сахара обеспечивала наилучшую стабилизацию и придавала наибольшую вязкость среди композиций с высокой концентрацией. Композиция, содержащая 5% сахара/1,5% L-пролина, занимала второе место по обеспечению стабильности через 28 дней при 40°C. После инкубации при 25°C в течение трех месяцев стабильность МАТ1 была почти одинаковой во всех исследуемых композициях; однако композиция, содержащая 5% сахара/1,5% L-пролина, сохранилась немного лучше, чем остальные две композиции. Однако при инкубации при -20°C, -30°C и -80°C сахара в концентрации 5% и 9% обеспечивала

лучшую стабильность, чем 3% пролин (Фигура 3). Вязкость 175 мг/мл композиции мАт1 с 5% сахарозы/1,5% L-пролина составляет 14 сП при 20°C. С целью получения композиции, представляющей собой изотонический раствор и имеющей наилучший баланс между стабильностью и вязкостью, было выбрано сочетание 5% сахарозы/1,5% L-пролина для поздней стадии разработки композиции ЛП антителя.

Пример 9: Выбор модификаторов вязкости

[0146] Вязкость белковых композиций увеличивается экспоненциально при увеличении концентрации белка. Если вязкость начинает превышать примерно 10–15 сП при 20°C, вязкость композиции следует учитывать при разработке композиции: просто потому, что вязкость коррелирует с легкостью инъекции при помощи предварительно заполненного шприца (ПЗШ) или другого игольного устройства для доставки; более важно, поддержание вязкости на разумно низком уровне является критическим для разработки устройства доставки, такого как автоинжекторное устройство. Эффект эксципиентов на вязкость композиции изучали в жидкой композиции со следующими потенциальными модификаторами вязкости: пролин, аргинин–HCl, гистидин–HCl, ацетат магния и NaCl. На Фигуре 4 показана вязкость 150 мг/мл композиции мАт1 с модификаторами вязкости. Аргинин–HCl, гистидин–HCl, ацетат магния и NaCl в концентрации 25–100 мМ снижают вязкость 150 мг/мл композиций мАт1.

[0147] Также изучали влияние модификаторов вязкости на стабильность композиции мАт1. Готовили 150 мг/мл композиции мАт1 с модификаторами вязкости, такими как аргинин–HCl, гистидин–HCl, ацетат магния и NaCl, и инкубировали при 45°C в течение 28 дней. Результаты представлены на Фигуре 5. Было установлено, что максимальная стабильность белка имела место, когда мАт1 было сформулировано без модификаторов вязкости; все эти модифицирующие вязкость соли отрицательно влияли на стабильность мАт1. Таким образом, соли не были включены в конечную композицию.

[0148] L-пролин в качестве стабилизатора минимизировал вязкость раствора при концентрации антителя, равной или превышающей 50 мг/мл. Результаты ускоренных исследований стабильности антителя в высокой концентрации с различными количествами L-пролина, с добавлением или без добавления сахарозы, приведены в Таблице 7. После инкубации при 25°C в течение трех месяцев композиция, содержащая 5% сахарозы/1,5% L-пролина, демонстрировала слегка улучшенную стабильность относительно остальных двух композиций с точки зрения образования ВМ вариантов. После инкубации при 40°C в течение 28 дней композиция, содержащая 9% сахарозы, демонстрировала наилучшую стабилизацию, и композиция, содержащая 5% сахарозы/1,5% L-пролина, занимала второе место. Композиция, содержащая 9% сахарозы, имеет вязкость 20 сП при концентрации антителя 175 мг/мл, в то время как вязкость 175 мг/мл композиции, содержащей 5% сахарозы/1,5% L-пролина, составляет 14 сП при 20°C. Добавление L-пролина в композицию важно для снижения вязкости при повышенных концентрациях белка, а также для стабилизации антителя.

[0149] Поводя итоги, сочетание 5% сахарозы/1,5% L-пролина было выбрано для

композиций антителя как в концентрации 50 мг/мл, так и в более высокой концентрации. Это сочетание эксципиентов позволяет получать изотоническую композицию с приемлемой стабильностью и вязкостью при всех протестированных концентрациях антителя (вплоть до 175 мг/мл).

Пример 10: Оптимизация концентрации полисорбата (ПС)

[0150] В процессе разработки композиции наблюдали образование вариантов с молекулярной массой более высокого порядка и увеличение мутности, когда композиция мАт1 перемешивали без сурфактанта. Белок стабилизировали при перемешивании путем добавления полисорбата 80 (ПС 80). В процессе разработки высококонцентрированной жидкой композиции мАт1 нестабильность при перемешивании имела место в виде увеличения образования вариантов с молекулярной массой более высокого порядка. Проводили исследование для определения минимального количества полисорбата 80, необходимого для защиты мАт1 в концентрации вплоть до 175 мг/мл от вызываемой перемешиванием нестабильности. Композиции в данном исследовании содержали 5% сахарозы и 1,5% L-пролина с тем, чтобы эффект полисорбата 80 можно было изучать с составом композиции, наиболее приближенным к конечной композиции. Минимальные концентрации полисорбата 80, включенные в исследование, составляли 0%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1%, 0,15% и 0,2% (масс/об). В отсутствие полисорбата 80 раствор становился непрозрачным и демонстрировал значительное увеличение мутности после перемешивания на вихревой мешалке. Наблюдали зависимое от концентрации полисорбата 80 уменьшение % ВМ после 120 минут перемешивания. Установлено, что концентрация 0,15–0,2% полисорбата 80 является достаточной для стабилизации 150 мг/мл и 175 мг/мл композиций мАт1 от вызываемой перемешиванием агрегации (Таблица 8). Добавление 0,2% (масс/об) (номинальное значение) полисорбата 80 полностью предотвращало образование ВМ вариантов после перемешивания в течение 120 минут.

Таблица 8: Стабильность 150 мг/мл и 175 мг/мл композиций мАт1 с ПС 80 после 120 мин перемешивания

Объем заполнения		0,4 мл				
Контейнер/Крышка		2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутылкаучука, покрытой FluroTec®				
Композиция	[ПС 80]	Цвет и внешний вид	Мутность (Увеличение OD при 405 нм)	pH	% Извлеченного мАт1, ОФ-СЭЖХ	Увеличение % ВМ, ЭХ-СЭЖХ
150 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, pH 6,0, 9% сахароза	0,00	Не годен	0,38	6,0	Не применимо	
	0,02	Годен	0,00	6,0	97	4,7
	0,04	Годен	0,00	6,0	100	0,3
	0,06	Годен	0,00	6,0	102	0,3
	0,08	Годен	0,04	6,0	99	0,0
	0,10	Годен	0,01	6,0	101	0,1
	0,15	Годен	0,00	6,0	98	0,1
	0,20	Годен	0,00	6,0	106	0,1
175 мг/мл мАт1, 10	0,00	Не годен	0,38	6,0	Не применимо	

мМ гистидин, рН 6,0, 3% пролин	0,02	Годен	0,06	6,1	100	7,0
	0,04	Годен	0,00	6,0	97	2,4
	0,06	Годен	0,01	6,1	700	2,3
	0,08	Годен	0,03	6,1	98	0,9
	0,10	Годен	0,00	6,1	102	0,4
	0,15	Годен	0,00	6,1	102	0,1
	0,20	Годен	0,00	6,1	101	0,1
175 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 5% сахараза, 1,5% пролин	0,00	Не годен	0,36	6,1	Не применимо	
	0,02	Годен	0,01	6,1	97	3,5
	0,04	Годен	0,01	6,1	98	2,0
	0,06	Годен	0,01	6,1	100	1,3
	0,08	Годен	0,01	6,1	99	1,0
	0,10	Годен	0,01	6,0	102	0,3
	0,15	Годен	0,00	6,1	101	0,2
	0,20	Годен	0,00	6,1	98	0,0

[0151] В Таблице 9 подробно показан эффект концентрации полисорбата 80 на стабильность 175 мг/мл композиции мАт1 после перемешивания (120 минут перемешивания на вихревой мешалке).

Таблица 9: Эффект концентрации полисорбата 80 на стабильность 175 мг/мл композиции мАт1 после перемешивания (120 минут перемешивания на вихревой мешалке)

Композиция	175 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 5% (масс/об) сахараза, 1,5% (масс/об) L-пролин									
	Объем заполнения									
	0,4 мл									
Контейнер/Крышка	2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутилкаучука, покрытой FluroTec®									
Номинальная конц. ПС 80, (% масс/об)	Цвет и внешний вид	Мутность (Увеличение OD при 405 нм)	рН	Извлеченного белка, ОФ-%	Изменение чистоты, ЭХ-СЭЖХ ^{а)}			Изменение заряженных вариантов, КО-СЭЖХ ^{а)}		
					% ВМ	% Нативного	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
0,00%	Не годен	0,36	6,0	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
0,02%	Годен	0,01	6,0	97	3,5	-3,5	0,0	-0,6	0,8	-0,1
0,04%	Годен	0,01	6,0	98	2,0	-2,0	0,0	0,1	-0,2	-0,2
0,06%	Годен	0,01	6,0	100	1,3	-1,3	0,0	-0,2	0,3	-0,1
0,08%	Годен	0,01	6,0	99	1,0	-1,0	0,0	-0,2	0,0	0,0
0,10%	Годен	0,02	6,0	102	0,3	-0,3	0,0	0,2	0,0	0,0
0,15%	Годен	0,00	6,1	101	0,2	-0,2	0,0	0,2	-0,3	0,1
0,20%	Годен	0,00	6,1	98	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,2

^{а)}Представлено в виде относительного изменения чистоты в сравнении с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 97,4\%$ в пике нативного белка при определении методом ЭХ-СЭЖХ и $\geq 48,2\%$ в основном пике при определении методом КО-СЭЖХ, во всех композициях.

КО, катионообменная (хроматография); ВМ, высокомолекулярные; НМ, низкомолекулярные; Н/П, не применимо; ОД, оптическая плотность; ОФ, обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0152] Способность 0,2% (масс/об) полисорбата 80 защищать мАт1 от вызываемой перемешиванием нестабильности была подтверждена в другом исследовании с конечной

композицией в концентрации 50 мг/мл (Таблица 10).

Таблица 10: Эффект концентрации ПС80 на стабильность 50 мг/мл композиции МАТ1 после перемешивания (120 минут перемешивания на вихревой мешалке)

Композиция		50 мг/мл МАТ1, 10 мМ L-гистидин, рН 6,0, 5% (масс/об) сахароза, 1,5% (масс/об) L-пролин								
Объем заполнения		0,6 мл								
Контейнер / Крышка		2-мл стеклянный флакон типа 1 с пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec [®]								
Конц. полисорбата 80, (% масс/об)	Цвет и внешний вид	Мутность (увеличение OD при 405 нм)	рН	Извлеченного белка, OD	Изменение чистоты, ЭХ-СЭЖХ ^а			Изменение заряженных вариантов, КО-СЭЖХ ^а		
					% ВМ	% Мономера	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
0,0%	Годен	0,01	6,1	99	8,0	-8,0	0,0	1,7	-1,8	-0,3
0,2%	Годен	0,00	6,1	99	0,0	0,1	-0,1	-0,2	0,1	-0,2

^аПредставлено в виде относительного изменения чистоты в сравнении с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) имеет $\geq 98,5\%$ в пике мономера при определении методом ЭХ-СЭЖХ и $\geq 52,8\%$ в основном пике при определении методом КО-СЭЖХ, во всех пяти композициях.

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; НМ, низкомолекулярные; Н/П, не применимо; OD, оптическая плотность; OF, обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0153] На основании этих результатов полисорбат 80 в концентрации 0,2% (масс/об) был выбран в качестве сурфактанта, поскольку он обеспечивал достаточную стабилизацию для предотвращения образования ВМ вариантов при стрессе, вызываемом перемешиванием.

Пример 11: Стабильность иллюстративных композиций при хранении и стрессе

[0154] Показатели стабильности при хранении 50 мг/мл и 175 мг/мл композиций МАТ1 в стеклянных флаконах приведены в Таблице 11 и Таблице 12, и данные по стабильности в условиях ускоренной деградации и стресса для двух композиций приведены в Таблице 13 и Таблице 14, соответственно. Исследования стабильности показали, что 50 мг/мл и 175 мг/мл композиции МАТ1 в стеклянных флаконах являются стабильными в течение по меньшей мере 24 месяцев в случае хранения при температуре от 2°C до 8°C. Кроме того, 50 мг/мл композиция МАТ1 также демонстрировала превосходную стабильность в условиях ускоренной деградации и стресса. Композиция стабильна при хранении при 25°C в течение по меньшей мере 3 месяцев и при 40°C в течение по меньшей мере 7 дней, что свидетельствует о совместимости 50 мг/мл композиции с основными компонентами контейнерной упаковки. Отсутствовали заметные

изменения в цвете или внешнем виде, мутности, содержании частиц, рН, концентрации белка, чистоте при измерении методами ЭХ–СЭЖХ или КО–СЭЖХ и дКИЭФ, активность также сохранялась в данных условиях.

Таблица 11: Исследование стабильности 50 мг/мл композиции, хранящейся при 2–8°C

Композиция		50 мг/мл МАТ1, 10 мМ L–гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L–пролин и 0,2% (масс/об) полисорбат 80								
Объем заполнения		1,2 мл								
Контейнер/Крышка		3–мл стеклянные флаконы типа 1 с 13–мм пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®								
Анализ		Продолжительность хранения при 2–8°C (месяцы)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Цвет и внешний вид		Годе	Годе	Годе	Годе	Годе	Годе	Годе	Годе	
		н	н	н	н	н	н	н	н	
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Мутность (НЕМ методом нефелометрии)		7,41	6,01	6,15	6,61	6,03	6,48	6,29	5,83	
рН		6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0	6,0	
Анализ не видимых глазом частиц, ИАС (N/мл)	≥10 мкм	2	Н/Т	21	8	Н/Т	11	15	21	
	≥25 мкм	0	Н/Т	2	0	Н/Т	1	1	1	
Анализ не видимых глазом частиц, ВМП (N/мл)	2–10 мкм	248	Н/Т	887	187	Н/Т	607	125	776	
	≥10 мкм	15	Н/Т	26	44	Н/Т	15	19	8	
	≥25 мкм	4	Н/Т	3	17	Н/Т	1	3	1	
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	100	98	103	101	105	98	98	
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный	99,2	Н/Т	Н/Т	98,7	Н/Т	98,9	99,2	99,2	
	% Основного пика									
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	Восстановленный	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	99,6	99,8	99,9	
	% тяжелой+легкой цепей									
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% ВМ	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	
	% Мономера	99,2	99,1	99,2	99,2	99,1	99,2	99,2	99,1	
	% НМ	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	18,9	19,0	18,7	19,1	19,4	19,1	20,7	20,5	
	% Основных	53,9	53,5	54,5	53,7	53,6	55,8	53,8	53,4	
	% Щелочных	27,3	27,6	26,8	27,2	27,1	25,1	25,5	26,0	
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	31,9	Н/Т	Н/Т	32,3	Н/Т	33,9	33,1	34,0	
	% Основных	54,7	Н/Т	Н/Т	54,2	Н/Т	54,0	54,0	53,9	

	% Щелочных	13,5	Н/Т	Н/Т	13,5	Н/Т	12,1	12,9	12,1	
% Относительной (биоанализ)	активности	126	Н/Т	Н/Т	127	Н/Т	125	110	104	

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Мономер, интактное антитело; Н/Т, не требуется; ОД, оптическая плотность; ОФ, обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Таблица 12: Исследование стабильности 175 мг/мл композиции, хранящейся при 2–8°C

Композиция		175 мг/мл мАт1, 10 мМ L-гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L-пролин и 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0								
Объем заполнения		1,2 мл								
Контейнер/Крышка		3-мл стеклянные флаконы типа 1 с 13-мм пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®								
Анализ		Продолжительность хранения при 5°C (месяцы)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Цвет и внешний вид		Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	
Мутность (Увеличение ОД при 405 нм)		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Мутность (НЕМ методом нефелометрии)		6,72	6,95	6,57	6,54	6,62	7,01	6,67	6,87	
рН		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,1	
Анализ не видимых глазом частиц, НАС (N/мл)	≥10 мкм	10	Н/Т	28	131	Н/Т	30	35	55	
	≥25 мкм	0	Н/Т	11	56	Н/Т	1	2	3	
Анализ не видимых глазом частиц, ВМП (N/мл)	2–10 мкм	144	Н/Т	441	244	Н/Т	265	319	117	
	≥10 мкм	22	Н/Т	36	22	Н/Т	29	28	8	
	≥25 мкм	1	Н/Т	11	7	Н/Т	3	10	1	
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	95	97	98	97	99	104	101	
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленны й; % Основного пика	97,9	Н/Т	98,1	98,0	Н/Т	97,9	98,0	97,9	
	Восстановленны й; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	99,6	100	Н/Т	99,8	99,8	99,8	
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0	
	% Мономера	99,1	98,9	99,1	98,7	98,7	98,7	98,6	98,6	
	% НМ	0,4	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	
Анализ заряженных	% Кислых	18,7	18,3	18,1	18,7	19,1	19,0	19,0	20,3	

вариантов, КО–СЭЖХ	% Основных	53,6	55,0	54,6	53,3	53,6	55,5	54,3	53,8
	% Щелочных	27,8	26,7	27,4	28,1	27,3	25,5	26,8	25,9
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	31,8	Н/Т	32,4	31,9	Н/Т	33,9	32,3	32,0
	% Основных	54,6	Н/Т	54,6	54,9	Н/Т	54,8	54,6	54,3
	% Щелочных	13,6	Н/Т	13,1	13,2	Н/Т	11,3	13,1	13,7
% Относительной (биоанализ)	активности	102	Н/Т	Н/Т	118	Н/Т	110	91	107

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Мономер, интактное антитело; Н/Т, не требуется; ОД, оптическая плотность; ОФ, обращенно–фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Таблица 13: Исследование стабильности 50 мг/мл композиции, хранящейся в условиях ускоренной деградации и стресса

Композиция		50 мг/мл МАт1, 10 мМ L–гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L–пролин, 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0						
Объем заполнения		1,2 мл						
Контейнер/Крышка		3–мл стеклянные флаконы типа 1 с 13–мм пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®						
		Хранение при 25°C/60% ОВ (месяцы)				Хранение при 40°C (дни)		
Анализ		0	1	3	6	7	14	28
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение ОД при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Мутность (НЕМ методом нефелометрии)		7,41	6,05	6,54	6,90	6,10	6,60	6,93
рН		6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0
Анализ не видимых глазом частиц, ИАС (#/мл)	≥10 мкм	2	Н/Т	17	21	Н/Т	Н/Т	18
	≥25 мкм	0	Н/Т	0	1	Н/Т	Н/Т	1
Анализ не видимых глазом частиц, ВМП (N/мл)	2–10 мкм	248	Н/Т	1618	1531	Н/Т	Н/Т	1543
	≥10 мкм	15	Н/Т	29	47	Н/Т	Н/Т	41
	≥25 мкм	4	Н/Т	2	15	Н/Т	Н/Т	15
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	100	100	103	103	102	98
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный	99,2	Н/Т	99,1	98,8	Н/Т	Н/Т	98,9
	% Основного пика Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	99,5	100	Н/Т	Н/Т	99,5
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,5	0,4	0,6	0,7	0,7	0,9	1,4
	% Момера	99,2	99,0	99,1	98,8	98,9	98,5	97,9
	% НМ	0,4	0,5	0,3	0,5	0,5	0,6	0,7

Анализ заряженных вариантов, СЭЖХ	КО	% Кислых	18,9	19,3	21,8	27,0	19,9	22,5	27,2
		% Основных	53,9	53,4	52,1	48,3	52,3	50,1	46,8
		% Щелочных	27,3	27,4	26,1	24,8	27,8	27,4	26,0
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ		% Кислых	31,9	Н/Т	38,1	43,7	Н/Т	Н/Т	45,4
		% Основных	54,7	Н/Т	48,6	44,3	Н/Т	Н/Т	42,1
		% Щелочных	13,5	Н/Т	13,3	12,0	Н/Т	Н/Т	12,5
% Относительной активности (биоанализ)			126	Н/Т	Н/Т	120	Н/Т	Н/Т	99

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Мономер, интактное антитело; Н/Т, не требуется; ОД, оптическая плотность; ОФ, обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Таблица 14: Исследование стабильности 175 мг/мл композиции, хранящейся в условиях ускоренной деградации и стресса

Композиция		175 мг/мл МАТ1, 10 мМ L-гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L-пролин, 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0							
Объем заполнения		1,2 мл							
Контейнер/Крышка		3-мл стеклянные флаконы типа 1 с 13-мм пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®							
		Хранение при 25°C/60% ОВ (месяцы)				Хранение при 40°C (дни)			
Анализ		0	1	3	6	7	14	28	
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	
Мутность (Увеличение ОД при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
Мутность (НЕМ методом нефелометрии)		6,72	6,77	6,82	6,99	6,90	7,30	7,56	
рН		6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	5,9	6,0	
Анализ не видимых глазом частиц, ИАС (#/мл)	≥10 мкм	10	Н/Т	28	58	Н/Т	Н/Т	97	
	≥25 мкм	0	Н/Т	13	16	Н/Т	Н/Т	44	
Анализ не видимых глазом частиц, ВМП (#/мл)	2–10 мкм	144	Н/Т	623	277	Н/Т	Н/Т	1131	
	≥10 мкм	22	Н/Т	25	8	Н/Т	Н/Т	531	
	≥25 мкм	1	Н/Т	3	2	Н/Т	Н/Т	3	
% Извлеченного белка, ОФ-СЭЖХ		100	95	97	99	98	99	95	
Чистота, МКЭ-SDS	Не восстановленный; % Основного пика	97,9	Н/Т	Н/Т	97,4	Н/Т	Н/Т	97,5	
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	99,7	Н/Т	Н/Т	99,4	
Чистота, ЭХ-СЭЖХ	% ВМ	0,6	0,9	1,2	1,5	1,7	2,6	3,9	
	% Мономера	99,1	98,6	98,5	98,0	97,7	96,8	95,5	
	% НМ	0,4	0,5	0,3	0,6	0,6	0,7	0,6	
Анализ заряженных вариантов, СЭЖХ	КО	% Кислых	18,7	18,9	21,3	26,2	19,7	22,0	23,9
		% Основных	53,6	54,4	52,3	48,3	51,7	50,1	49,4
		% Щелочных	27,8	26,7	26,4	25,5	28,6	27,9	26,7
Анализ заряженных вариантов, СЭЖХ		% Кислых	31,8	Н/Т	37,0	45,0	Н/Т	Н/Т	47,3
		% Основных	54,6	Н/Т	50,3	43,3	Н/Т	Н/Т	39,2

вариантов, дКИЭФ	% Щелочных	13,6	Н/Т	12,7	11,7	Н/Т	Н/Т	13,5
% Относительной (биоанализ)	активности	102	Н/Т	Н/Т	123	Н/Т	Н/Т	86

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Мономер, интактное антитело; Н/Т, не требуется; ОД, оптическая плотность; ОФ, обращенно–фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Пример 12: Стабильность композиций МАТ1, содержащих гистидиновый буфер, сахарозу и полисорбат

[0155] В Таблицах 15–24 приведены данные по стабильности при хранении иллюстративных композиций МАТ1, содержащих 10 мМ гистидиновый буфер, рН 6,0, сахарозу и полисорбат.

Таблица 15: Исследование стабильности композиции МАТ1, хранящейся при –80°С

Композиция		72,2 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 5% (масс/об) сахароза					
Объем заполнения		1,0 мл					
Контейнер/Крышка		5–мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой закручивающейся крышкой					
		Продолжительность хранения при –80°С (месяцы)					
Анализ		0	1	3	6	9	12
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение ОД при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		6,2	6,3	6,2	6,1	6,2	6,1
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	94	95	98	95	94
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	Н/Т	99,5	Н/Т	99,2
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	99,8
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6
	% Нативного	98,7	98,8	98,9	98,7	98,9	98,8
	% НМ	0,6	0,6	0,5	0,6	0,4	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,2	22,2	22,6	23,2	24,1	23,5
	% Основных	49,7	49,8	48,9	46,8	45,2	44,1
	% Щелочных	28,1	28,0	28,5	30,0	30,7	32,4
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	38,9	Н/Т	Н/Т	39,1	Н/Т	37,5
	% Основных	56,5	Н/Т	Н/Т	56,2	Н/Т	57,2
	% Щелочных	4,6	Н/Т	Н/Т	4,7	Н/Т	5,3
% Относительной активности (биоанализ)		95	Н/Т	Н/Т	81	Н/Т	120

КО, катионообменная (хроматография); ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; МКЭ–SDS=капиллярный электрофорез с микрофлюидными чип–анализаторами–додecilсульфат натрия; ВМП, визуализация микропотока; Н/Т, не требуется; ОД, оптическая плотность; ОВ=относительная влажность; ОФ, обращенно–фазовая

(хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Таблица 16: Исследование стабильности композиции МАТ1, хранящейся при –30°С

Композиция		72,2 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 5% (масс/об) сахара					
Объем заполнения		1,0 мл					
Контейнер/Крышка		5-мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой					
		Продолжительность хранения при –30°С (месяцев)					
Анализ		0	1	3	6	9	12
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
рН		6,2	6,3	6,2	6,1	6,2	6,1
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	93	95	100	96	96
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	Н/Т	99,1	Н/Т	99,2
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	99,8
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
	% Нативного	98,7	98,8	99,0	98,7	98,9	98,8
	% НМ	0,6	0,5	0,4	0,6	0,4	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,2	22,5	22,5	23,4	24,2	23,4
	% Основных	49,7	49,6	48,9	46,6	45,6	44,1
	% Щелочных	28,1	28,0	28,6	30,0	30,2	32,5
Анализ заряженных вариантов, ДКИЭФ	% Кислых	38,9	Н/Т	Н/Т	38,2	Н/Т	37,8
	% Основных	56,5	Н/Т	Н/Т	56,3	Н/Т	56,6
	% Щелочных	4,6	Н/Т	Н/Т	5,5	Н/Т	5,7

Таблица 17: Исследование стабильности композиции МАТ1, хранящейся при –20°С

Композиция		72,2 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 5% (масс/об) сахара					
Объем заполнения		1,0 мл					
Контейнер/Крышка		5-мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой					
		Продолжительность хранения при –20°С (месяцы)					
Анализ		0	1	3	6	9	12
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01
рН		6,2	6,3	6,2	6,1	6,1	6,2
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	95	97	101	98	98
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	Н/Т	99,5	Н/Т	99,3
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	99,9
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7
	% Нативного	98,7	98,8	98,9	98,6	98,8	98,8

	% НМ	0,6	0,5	0,5	0,7	0,4	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,2	22,4	22,3	22,4	24,6	23,4
	% Основных	49,7	49,7	49,2	47,6	45,5	44,2
	% Щелочных	28,1	27,9	28,5	30,0	30,0	32,5
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	38,9	Н/Т	Н/Т	38,6	Н/Т	38,6
	% Основных	56,5	Н/Т	Н/Т	56,8	Н/Т	56,2
	% Щелочных	4,6	Н/Т	Н/Т	4,6	Н/Т	5,3
% Относительной активности (биоанализ)		95	Н/Т	Н/Т	96	Н/Т	111

Таблица 18: Исследование стабильности композиции МАТ1 – эффект условий ускоренной деградации

Композиция		72,2 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 5% (масс/об) сахара						
Объем заполнения		1,0 мл						
Контейнер/Крышка		5–мл поликарбонатный флакон с высланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой						
			Хранение при 5°C (дни)		Хранение при 25°C/60% ОВ (дни)		Хранение при 40°C/75% ОВ (дни)	
Анализ		T=0	28	56	14	28	14	28
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,05
рН		6,2	6,2	6,1	6,2	6,2	6,2	6,1
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	96	100	97	100	105	113
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	99,1	Н/Т	99,5	Н/Т	99,1
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	100	Н/Т	99,2	Н/Т	98,7
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,9	1,1	1,4	1,7	3,1	4,6
	% Нативного	98,7	98,5	98,4	98,0	97,7	96,1	94,6
	% НМ	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,2	22,2	22,3	22,0	22,6	25,6	30,8
	% Основных	49,7	49,8	48,9	49,6	49,1	46,0	41,7
	% Щелочных	28,1	28,1	28,8	28,4	28,3	28,3	27,5
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	38,9	Н/Т	39,0	Н/Т	41,1	Н/Т	58,2
	% Основных	56,5	Н/Т	56,8	Н/Т	53,8	Н/Т	36,3
	% Щелочных	4,6	Н/Т	4,2	Н/Т	5,1	Н/Т	5,5
% Относительной активности (биоанализ)		95	Н/Т	95	Н/Т	84	Н/Т	87

Таблица 19: Исследование стабильности композиции МАТ1, хранящейся при –80°C

Композиция		25 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 10% (масс/об) сахара, 0,1% полисорбат 80					
Объем заполнения		1,0 мл					
Контейнер/Крышка		5–мл поликарбонатный флакон с высланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой					
		Продолжительность хранения при –80°C (месяцы)					
Анализ		0	1	3	6	9	12

Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
pH		6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,0
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	100	97	95	100	99
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	Н/Т	99,4	Н/Т	99,5
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	100
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	% Нативного	98,6	98,7	98,6	98,6	98,8	98,7
	% НМ	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,8	23,0	23,3	23,5	23,9	25,4
	% Основных	47,3	47,3	46,2	45,3	44,2	44,2
	% Щелочных	30,0	29,8	30,6	31,2	31,9	30,4
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	40,1	Н/Т	Н/Т	38,1	Н/Т	41,3
	% Основных	56,1	Н/Т	Н/Т	57,4	Н/Т	54,1
	% Щелочных	3,8	Н/Т	Н/Т	4,6	Н/Т	4,6
% Относительной активности (биоанализ)		112	Н/Т	Н/Т	130	Н/Т	107

Таблица 20: Исследование стабильности композиции МАТ1, хранящейся при –30°С

Композиция	25 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 10% (масс/об) сахароза, 0,1% полисорбат 80						
Объем заполнения	1,0 мл						
Контейнер/Крышка	5–мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой						
	Продолжительность хранения при –30°С (месяцы)						
Анализ	0	1	3	6	9	12	
Цвет и внешний вид	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	
pH	6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,0	
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ	100	100	102	97	100	102	
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	Н/Т	99,1	Н/Т	99,5
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	100
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	% Нативного	98,6	98,7	98,6	98,7	98,8	98,7
	% НМ	0,6	0,5	0,6	0,6	0,4	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,8	23,1	22,9	23,5	23,7	25,1
	% Основных	47,3	47,1	46,5	45,3	44,4	44,4
	% Щелочных	30,0	29,8	30,6	31,2	31,9	30,5
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	40,1	Н/Т	Н/Т	38,0	Н/Т	41,3
	% Основных	56,1	Н/Т	Н/Т	57,3	Н/Т	53,3
	% Щелочных	3,8	Н/Т	Н/Т	4,7	Н/Т	5,4

Таблица 21: Исследование стабильности композиции МАТ1, хранящейся при –20°С

Композиция	25 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 10% (масс/об) сахароза, 0,1% полисорбат 80
Объем заполнения	1,0 мл
Контейнер/Крышка	5–мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой

Анализ		завинчивающейся крышкой					
		Продолжительность хранения при –20°C (месяцы)					
		0	1	3	6	9	12
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
pH		6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,0
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	99	102	97	106	102
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	Н/Т	99,4	Н/Т	99,4
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	99,0
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8
	% Нативного	98,6	98,7	98,6	98,7	98,8	98,7
	% НМ	0,6	0,5	0,6	0,6	0,4	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,8	22,9	23,5	23,6	24,3	25,2
	% Основных	47,3	47,3	46,0	45,2	43,8	43,9
	% Щелочных	30,0	29,8	30,6	31,2	31,9	30,8
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	40,1	Н/Т	Н/Т	38,4	Н/Т	41,6
	% Основных	56,1	Н/Т	Н/Т	57,9	Н/Т	53,3
	% Щелочных	3,8	Н/Т	Н/Т	3,7	Н/Т	5,1
% Относительной активности (биоанализ)		112	Н/Т	Н/Т	120	Н/Т	131

Таблица 22: Исследование стабильности композиции МАт1 – эффект условий ускоренной деградации

Композиция		25 мг/мл МАт1, 10 мМ гистидин, pH 6,0, 10% (масс/об) сахара, 0,1% полисорбат 80						
Объем заполнения		1,0 мл						
Контейнер/Крышка		5–мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой						
		Без хранения	Хранение при 5°C (дни)		Хранение при 25°C/60% ОВ (дни)		Хранение при 40°C/75% ОВ (дни)	
Анализ		T=0	28	56	14	28	14	28
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03
pH		6,1	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0	6,0
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	101	102	106	107	113	114
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	99,1	Н/Т	99,5	Н/Т	99,3
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	100	Н/Т	100	Н/Т	99,1
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,8	0,7	0,7	0,9	0,9	3,4	5,0
	% Нативного	98,6	98,8	98,7	98,6	98,6	95,7	93,7
	% НМ	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,9	1,3

Анализ заряженных вариантов, КО-СЭЖХ	% Кислых	22,8	22,8	23,3	22,6	22,8	29,6	32,5
	% Основных	47,3	47,3	46,1	47,2	47,0	39,5	36,4
	% Щелочных	30,0	29,9	30,6	30,2	30,2	30,9	31,1
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	40,1	Н/Т	39,8	Н/Т	40,2	Н/Т	53,7
	% Основных	56,1	Н/Т	57,0	Н/Т	55,9	Н/Т	42,2
	% Щелочных	3,8	Н/Т	3,2	Н/Т	3,9	Н/Т	4,0
% Относительной активности (биоанализ)		112	Н/Т	103	Н/Т	91	Н/Т	79

Таблица 23: Исследование стабильности композиции мАт1, хранящейся при 5°C

Композиция		25 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, 10% (масс/об) сахара, 0,1% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0					
Объем заполнения		1,0 мл					
Контейнер/Крышка		2-мл флаконы из боросиликатного стекла типа 1 с 13-мм пробками West S2-451 4432/50 GRY B2-40, покрытыми FluroTec®					
		Продолжительность хранения при 5°C (месяцы)					
Анализ		0	1	3	6	9	12
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
рН		6,2	6,1	6,1	6,1	6,0	6,1
Анализ частиц, ВМП (частиц/мл)	2–10 мкм	823	Н/Т	Н/Т	2169	Н/Т	293,31
	≥10 мкм	15	Н/Т	Н/Т	10	Н/Т	56
	≥25 мкм	0	Н/Т	Н/Т	3	Н/Т	5
% Извлеченного белка, ОФ-СЭЖХ		100	100	98	101	102	90
Чистота, МКЭ-SDS	Не восстановленный;	99,4	Н/Т	Н/Т	99,5	Н/Т	99,2
	% Основного пика Восстановленный;	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	100
Чистота, ЭХ-СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9
	% Нативного	98,7	98,8	98,7	98,6	98,6	98,5
	% НМ	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО-СЭЖХ	% Кислых	23,0	22,8	23,5	22,4	24,1	22,4
	% Основных	48,5	48,6	46,2	47,2	44,4	45,5
	% Щелочных	28,6	28,6	30,4	30,4	31,5	32,1
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	39,8	Н/Т	Н/Т	39,2	Н/Т	40,1
	% Основных	56,7	Н/Т	Н/Т	56,5	Н/Т	55,7
	% Щелочных	3,4	Н/Т	Н/Т	4,3	Н/Т	4,1
% Относительной активности (биоанализ)		111	Н/Т	Н/Т	132	Н/Т	124

Таблица 24: Исследование стабильности композиции мАт1, хранящейся в условиях ускоренной деградации

Композиция		25 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, 10% (масс/об) сахара, 0,1% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0						
Объем заполнения		1,0 мл						
Контейнер/Крышка		2-мл флаконы из боросиликатного стекла типа 1 с 13-мм пробками West S2-451 4432/50 GRY B2-40, покрытыми FluroTec®						
		Хранение при 25°C/60% ОВ (месяцы)			Хранение при 45°C (дни)			
Анализ		0	0,5	1	3	7	14	28

Цвет и внешний вид		Годен						
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02
pH		6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	6,1	6,1
Анализ частиц, ВМП (частиц/мл)	2–10 мкм	823	Н/Т	Н/Т	1056	Н/Т	Н/Т	521
	≥10 мкм	15	Н/Т	Н/Т	23	Н/Т	Н/Т	83
	≥25 мкм	0	Н/Т	Н/Т	3	Н/Т	Н/Т	4
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ			99	100	99	99	100	99
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,4	Н/Т	Н/Т	99,4	Н/Т	Н/Т	99,2
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	Н/Т	98,6
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,8	0,9	1,1	1,6	3,2	8,5
	% Нативного	98,7	98,6	98,5	98,1	97,6	95,9	89,7
	% НМ	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8	1,0	1,8
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	23,0	22,6	23,1	25,8	24,7	27,3	34,0
	% Основных	48,5	48,7	48,1	44,5	46,2	44,1	35,9
	% Щелочных	28,6	28,8	28,9	29,8	29,1	28,6	30,2
Анализ заряженных вариантов, ДКИЭФ	% Кислых	39,8	Н/Т	Н/Т	47,1	Н/Т	Н/Т	66,9
	% Основных	56,7	Н/Т	Н/Т	49,5	Н/Т	Н/Т	30,2
	% Щелочных	3,4	Н/Т	Н/Т	3,5	Н/Т	Н/Т	3,0
% Относительной активности, биоанализ		111	Н/Т	Н/Т	94	Н/Т	Н/Т	63

[0156] В Таблицах 25–27 приведены данные по стабильности иллюстративных композиций при стрессе.

Таблица 25: Исследование стабильности композиции МАт1 – эффект стрессовых условий

Композиция		72,2 мг/мл МАт1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 5% (масс/об) сахара				
Объем заполнения		1,0 мл				
Контейнер/Крышка		5–мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой				
			Перемешивание (мин)		Замораживание/Размораживание (циклы)	
Анализ		T=0	10	15	4	8
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,09	0,01	0,00
pH		6,2	6,2	6,2	6,3	6,3
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	100	99	95	95
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	99,2	Н/Т	99,4
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	100	Н/Т	100
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,8	4,6	0,6	0,7
	% Нативного	98,7	98,7	94,9	98,9	98,8
	% НМ	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5
Анализ заряженных вариантов	% Кислых	22,2	22,2	21,9	22,0	22,2
	% Основных	49,7	49,6	49,9	49,7	49,6

вариантов, КО–СЭЖХ	% Щелочных	28,1	28,2	28,2	28,3	28,2
Анализ заряженных вариантов, ДКИЭФ	% Кислых	38,9	Н/Т	40,8	Н/Т	39,0
	% Основных	56,5	Н/Т	54,7	Н/Т	56,5
	% Щелочных	4,6	Н/Т	4,6	Н/Т	4,5
% Относительной активности (биоанализ)		95	Н/Т	87	Н/Т	89

Таблица 26: Исследование стабильности композиции МАТ1 – эффект стрессовых условий

Композиция		25 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, рН 6,0, 10% (масс/об) сахароза, 0,1% (масс/об) полисорбат 80				
Объем заполнения		1,0 мл				
Контейнер/Крышка		5–мл поликарбонатный флакон с выстланной силиконом полипропиленовой завинчивающейся крышкой				
		Без стресса	Перемешивание (минуты)		Замораживание/Размораживание (циклы)	
Анализ		T=0	60	120	4	8
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	101	100	99	100
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,5	Н/Т	99,5	Н/Т	99,6
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	100	Н/Т	100
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8
	% Нативного	98,6	98,7	98,7	98,7	98,6
	% НМ	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	22,8	22,8	22,8	22,9	22,7
	% Основных	47,3	47,2	47,3	47,1	47,2
	% Щелочных	30,0	30,0	29,2	30,1	30,1
Анализ заряженных вариантов, ДКИЭФ	% Кислых	40,1	Н/Т	39,6	Н/Т	40,0
	% Основных	56,1	Н/Т	56,9	Н/Т	56,3
	% Щелочных	3,8	Н/Т	3,5	Н/Т	3,6
% Относительной активности (биоанализ)		112	Н/Т	106	Н/Т	137

Таблица 27: Исследование стабильности композиции МАТ1 – эффект стрессовых условий

Композиция		25 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, 10% (масс/об) сахарозы, 0,1% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0				
Объем заполнения		1,0 мл				
Контейнер/Крышка		2–мл флаконы из боросиликатного стекла типа 1 с 13–мм пробками West S2–451 4432/50 GRV B2–40, покрытыми FluroTec®				
			Перемешивание (мин)		Замораживание/Размораживание (циклы)	
Анализ		0	60	120	4	8
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		6,2	6,2	6,2	6,2	6,2

Анализ частиц, ВМП (частиц/мл)	2–10 мкм	823	Н/Т	1170	Н/Т	1404	
	≥10 мкм	15	Н/Т	38	Н/Т	67	
	≥25 мкм	0	Н/Т	0	Н/Т	2	
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ			100	101	101	101	
Чистота, SDS	МКЭ	Не восстановленный; % Основного пика	99,4	Н/Т	99,4	Н/Т	99,3
		Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	100	Н/Т	100
Чистота, СЭЖХ	ЭХ	% ВМ	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7
		% Нативного	98,7	98,8	98,7	98,7	98,6
		% НМ	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
Анализ заряженных вариантов, СЭЖХ	КО	% Кислых	23,0	22,9	22,8	22,8	22,7
		% Основных	48,5	48,3	48,4	48,4	48,5
		% Щелочных	28,6	28,8	28,8	28,8	28,8
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ		% Кислых	39,8	Н/Т	39,6	Н/Т	39,6
		% Основных	56,7	Н/Т	56,9	Н/Т	56,9
		% Щелочных	3,4	Н/Т	3,4	Н/Т	3,6
% Относительной активности, биоанализ			111	Н/Т	90	Н/Т	129

Таблица 28: Стабильность в условиях ускоренного старения композиций и стресса 50 мг/мл и 25 мг/мл композиций МАТ1

Композиция	50 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, 10% (масс/об) сахара, 0,1% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0			25 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, 10% (масс/об) сахара, 0,1% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0				
	1,0 мл			1,0 мл				
Объем заполнения	2–мл флаконы из боросиликатного стекла типа 1 с 13–мм пробками West S2–451 4432/50 GRY B2–40, покрытыми FluroTec®			2–мл флаконы из боросиликатного стекла типа 1 с 13–мм пробками West S2–451 4432/50 GRY B2–40, покрытыми FluroTec®				
Контейнер/Крышка								
Анализ	T=0	25°C/60% ОВ 1 месяц	45°C 28 дней	T=0	25°C/60% ОВ 1 месяц	45°C 28 дней		
Цвет и внешний вид	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи		
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)	0,00	0,01	0,02	0,00	0,01	0,02		
рН	6,0	6,0	6,1	6,2	6,1	6,1		
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ	100	103	113	100	100	99		
Чистота, СЭЖХ	ЭХ	% ВМ	1,9	4,0	10,8	0,7	0,9	8,5
		% Мономера	97,5	95,2	88,0	98,7	98,5	89,7
		% НМ	0,6	0,8	1,2	0,6	0,6	1,8
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ		% Кислых	24,6	29,0	37,1	23,0	23,1	34,0
		% Основных	49,9	42,5	33,2	48,5	48,1	35,9
		% Щелочных	25,6	28,5	29,7	28,6	28,9	30,2

Пример 13: Исследование достоверного допустимого диапазона (ДДД)

[0157] При производстве лекарственного продукта (ЛП) МАТ1 могут иметь место вариации в составе ЛП. Эти вариации могут включать вариации в концентрации активного ингредиента, концентрации эксципиентов и/или рН композиции. Поскольку изменения в любом из этих параметров могут потенциально влиять на стабильность или активность лекарственного продукта, были проведены исследования достоверного

допустимого диапазона (ДДД) для оценки того, будут ли вариации в составе ЛП в пределах определенных диапазонов влиять на стабильность или активность ЛП мАт1.

[0158] Два исследования, разработанные на основании дизайна эксперимента (ДЭ), были использованы для оценки эффекта каждого параметра композиции, а также их взаимодействия, на стабильность композиции:

- Пре-ДДД исследование частичного факторного дизайна с оценкой стабильности в условиях ускоренной деградации и стресса для идентификации критических параметров композиции, которые могут влиять на стабильность ЛП мАт1;

- ДДД исследование полного факторного дизайна, включающее критические параметры композиции, идентифицированные в пре-ДДД исследовании, с изучением стабильности при долгосрочном хранении с целью выяснения приемлемых диапазонов параметров композиции.

План исследования пре-ДДД

[0159] Для оценки критических и/или взаимодействующих параметров композиции в композиции ЛП, которые могут быть важны для качества продукта, использовали частичный факторный ДЭ для изучения стабильности композиций в условиях ускоренной деградации и стресса путем варьирования всех параметров композиции, включая концентрацию белка ($\pm 10\%$), концентрации буфера и стабилизатора ($\pm 20\%$), концентрацию сурфактанта ($\pm 50\%$) и pH ($\pm 0,3$ единицы). Тестируемые диапазоны параметров композиции были определены таким образом, чтобы соответствовать, или превышать, критериям приемлемости в спецификации и в производственной практике. Исследование было спланировано при помощи статистической программы с использованием 2^{6-2} разрешения IV дробного факторного эксперимента. Наряду с четырьмя целевыми композициями в качестве центральных точек, исследование включало 20 экспериментов, как показано в Таблице 29.

Таблица 29: Композиции, тестированные в исследовании пре-ДДД

Композиция	[мАт1] мг/мл	[гистидин] мМ	% сахарозы (масс/об)	% L-пролина (масс/об)	% полисорбата 80 (масс/об)	pH
1	45	12	4	1,2	0,3	6,3
2	45	12	4	1,8	0,3	5,7
3	45	8	6	1,8	0,3	6,3
4	50	10	5	1,5	0,2	6,0
5	45	8	4	1,8	0,1	6,3
6	55	8	6	1,2	0,1	6,3
7	55	8	4	1,2	0,3	6,3
8	50	10	5	1,5	0,2	6,0
9	55	12	6	1,8	0,3	6,3
10	45	12	6	1,2	0,1	6,3
11	55	8	4	1,8	0,3	5,7
12	55	8	6	1,8	0,1	5,7
13	45	12	6	1,8	0,1	5,7
14	55	12	6	1,2	0,3	5,7
15	50	10	5	1,5	0,2	6,0
16	45	8	6	1,2	0,3	5,7
17	55	12	4	1,8	0,1	6,3
18	45	8	4	1,2	0,1	5,7
19	50	10	5	1,5	0,2	6,0

20	55	12	4	1,2	0,1	5,7
----	----	----	---	-----	-----	-----

[0160] Все 20 композиций в условиях ускоренной деградации и стресса (25°C, 37°C, замораживание/размораживание [З/Р] и перемешивание) были охарактеризованы и оценены в отношении физических/химических свойств и стабильности, включая визуальную инспекцию, pH, мутность, осмоляльность, проводимость, чистоту, концентрацию и извлечение белка, анализ заряженных вариантов и анализ не видимых невооруженным глазом частиц.

Результаты исследования пре-ДДД

[0161] Все 20 композиций демонстрировали отсутствие изменений после перемешивания или стресса при З/Р. Результаты инкубации при температурах 25°C и 37°C анализировали с использованием регрессионной модели (модель соответствия JMP с персонализацией «standard least square» и опцией «effect leverage emphasis»). Статистический анализ основных и взаимодействующих переменных для всех экспериментальных композиций в отношении критических качественных характеристик показал, что pH, концентрация белка и концентрация сахарозы являются важными для качества продукта. Двумя подверженными влиянию качественными характеристиками продукта были ВМ варианты и кислые заряженные варианты. Другие параметры композиции, включая концентрации гистидина, пролина или полисорбата 80, в пределах тестируемых диапазонов, как было установлено, не оказывают статистически значимое влияние на качество продукта. В условиях ускоренной деградации не было обнаружено вторичных или более высокой степени взаимодействий, влияющих на стабильность композиции. Результаты пре-ДДД исследования показали, что pH, концентрация мАт1 и концентрация сахарозы чрезвычайно важны для стабильности композиции мАт1, и они были сочтены критическими параметрами композиции для 50 мг/мл композиции мАт1.

[0162] Хотя pH, концентрация мАт1 и концентрация сахарозы были идентифицированы как критические параметры композиции, влияние этих трех факторов на качественные характеристики было минимальным. На основании результатов статистического анализа, изменение диапазона pH 5,7–6,3, концентрации мАт1 45–55 мг/мл и/или концентрации сахарозы 4–6%, по всей вероятности, оказывало влияние в размере <15% на образование ВМ вариантов и кислых заряженных вариантов.

[0163] Для подтверждения влияния на стабильность при долгосрочном хранении в рекомендованных условиях хранения ЛП, следующие три важных параметра композиции: pH, концентрация мАт1 и концентрация сахарозы, были дополнительно оценены в ДДД исследовании стабильности при долгосрочном хранении.

План исследования ДДД

[0164] Использовали полный факторный ДЭ для изучения стабильности при долгосрочном хранении композиций с варьирующими значениями pH ($\pm 0,3$ единицы), концентрации белка ($\pm 10\%$) и концентрации сахарозы ($\pm 20\%$), следствием чего стали восемь экспериментов (Таблица 30); эталонная композиция (композиция 3, целевая композиция в Таблице 30) была включен в качестве центральной композиции.

Таблица 30: Композиции, тестированные в исследовании ДДД

Композиция	[мАт1] мг/мл	[гистидин] мМ	% сахарозы (масс/об)	% L- пролина (масс/об)	% полисорбата 80 (масс/об)	pH
1	55	10	6	1,5	0,2	5,7
2	45	10	6	1,5	0,2	5,7
3	50	10	5	1,5	0,2	6,0
4	55	10	6	1,5	0,2	6,3
5	55	10	4	1,5	0,2	6,3
6	55	10	4	1,5	0,2	5,7
7	45	10	4	1,5	0,2	6,3
8	45	10	4	1,5	0,2	5,7
9	45	10	6	1,5	0,2	6,3

[0165] Полный факторный дизайн исследования позволяет оценивать все основные эффекты, а также эффекты взаимодействия. Тестируемые диапазоны параметров композиции, определенные таким образом, чтобы соответствовать, или превышать, критерии приемлемости в спецификации и в производственной практике, оставались такими же, как и в пре-ДДД исследовании.

[0166] Стабильность экспериментальных композиций сравнивали со стабильностью эталонной композиции, при pH 6,0, содержащей все компоненты композиции в их номинальных концентрациях (F3). В ДДД исследованиях использовали лот ЛС мАт1, изготовленный с использованием репрезентативного коммерческого производственного процесса. Композиции ЛП вносили в 10-мл Schott флаконы из боросиликатного стекла типа 1 с 20-мм пробками West S2-451 4432/50 GRV B2-40, покрытыми FlugoTec® (коммерческое представление ЛП), и оценивали на стабильность при долгосрочном хранении при 2–8°C. Композиции оценивали в соответствии с планом анализа, приведенным в Таблице 31.

Таблица 31: План анализа для исследования ДДД

Тест	Анализируемые образцы	Качественные характеристики
Внешний вид	Все	Цвет, видимые частицы
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)	Все	Цвет, частицы, прозрачность
Мутность, нефелометрия	t=0, 6, 12, 18, 24 и 36 месяцев при 5°C	Прозрачность (осадок в растворе, частицы, опалесценция)
pH	Все	pH
Общее содержание белка, ОФ-СЭЖХ	t=0	Концентрация белка
Осмоляльность	t=0	Концентрация растворенных веществ
Проводимость	t=0	Свойство проводимости
Чистота, ЭХ-СЭЖХ	Все	Варианты с разной молекулярной массой: % ВМ, % Мономера, % НМ
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	t=0, 6, 12, 18, 24 и 36 месяцев при 5°C	Заряженные изоформы: % Кислых, % Основных, % Щелочных
Частицы (счетно-фотометрический метод)	t=0, 6, 12, 18, 24 и 36 месяцев при 5°C	Не видимые глазом частицы. Критерии приемлемости приведены в USP <788> (<6000 частиц/контейнер для частиц ≥10 мкм и <600 частиц/контейнер для частиц ≥25 мкм)
Частицы (визуализация микропотока, ВМП)	t=0, 6, 12, 18, 24 и 36 месяцев при 5°C	Не видимые глазом частицы (только для информации)

Биоанализ	t=0, 6, 12, 18, 24 и 36 месяцев при 5°C	Активность Критерии приемлемости активности: 50–150% от эталонного стандарта
-----------	---	---

Результаты исследования ДДД

Эффект на образование ВМ вариантов

[0167] Во всех 9 композициях отсутствовало значимое увеличение % ВМ при измерении методом ЭХ–СЭЖХ через период времени вплоть до 12 месяцев при 2–8°C. Все полученные значения были намного ниже верхнего предела, указанного в спецификации, и с течением времени отсутствовало значительное увеличение % ВМ.

[0168] Как показано, образование ВМ вариантов в 50 мг/мл ЛП мАт1 при 2–8°C происходит чрезвычайно медленно. За срок вплоть до 12 месяцев максимальное изменение относительного количества % ВМ в 9 композициях составляло ~0,2%. Поскольку изменение % ВМ было минимальным, и концентрацию мономера можно было считать постоянной, агрегацию из мономеров в ВМ варианты можно было упрощенно считать реакцией нулевого порядка. Вследствие этого, использовали упрощенную линейную модель для анализа данных по стабильности на основании % ВМ. Путем построения линейной кривой зависимости % ВМ от времени определяли скорость образования ВМ вариантов для каждой композиции.

[0169] Скорость анализировали относительно основных факторов, а также их взаимодействия, с использованием регрессионной модели (модель соответствия JMP с персонализацией «standard least square» и опцией «effect leverage emphasis»). Полученная регрессионная модель была статистически значимой с $R^2=0,74$. Концентрация мАт1, рН и время были статистически значимыми, однако эффект на образование % ВМ вариантов был статистически незначимым, со вкладом лишь до 0,1%.

[0170] Таким образом, эти факторы, рН в диапазоне 5,7–6,3, концентрация мАт1 в диапазоне 45–55 мг/мл и концентрация сахарозы в диапазоне 4–6%, практически не оказывали влияния на стабильность в отношении % ВМ при 2–8°C.

[0171] Показатели % ВМ во всех 9 композициях в течение периода времени вплоть до 12 месяцев были намного ниже установленного предела критериев приемлемости 4% и, следовательно, соответствовали спецификации для выпуска и окончания срока хранения. Кроме того, на основании линейных моделей было предсказано, что через 24 месяца хранения при 2°C – 8°C % ВМ в диапазоне от 0,6% до 0,8% также был бы ниже установленного в спецификации предела.

[0172] На основании данных по стабильности при долгосрочном хранении вариации критических параметров композиции в пределах изученных диапазонов были признаны не оказывающими значительного влияния на стабильность композиции мАт1. Композиция мАт1 с концентрацией 50 мг/мл был надежным с точки зрения образования ВМ вариантов в протестированном диапазоне композиций композиции.

Эффект на образование кислых заряженных вариантов

[0173] Во всех 9 композициях отсутствовало значимое увеличение % кислых заряженных вариантов при измерении через период времени вплоть до 12 месяцев при 2–

8°C. Все полученные значения были ниже верхнего предела, указанного в спецификации, и с течением времени отсутствовало значительное увеличение % кислых заряженных вариантов.

[0174] Композиция мАт1 была признана надежной с точки зрения образования кислых заряженных вариантов в протестированном диапазоне композиций композиции.

Эффект на общие качественные характеристики

[0175] Изучали эффект рН, концентраций мАт1 и сахарозы, а также срока хранения, на другие общие качественные характеристики ЛП, включая внешний вид, рН, мутность, не видимые невооруженным глазом частицы, извлечение белка, % мономера и % НМ при определении методом ЭХ, % основных и % щелочных заряженных вариантов при определении методом дКИЭФ, а также биологическую активность. Все значения находились в пределах, указанных в спецификации, и отсутствовали какие-либо значимые изменения с течением времени или отличия между композициями в исследовании ДДД:

- Осадки или видимые частицы не были обнаружены ни при визуальной инспекции, ни при измерении мутности (ОД при 405 нм и нефелометрия);

- Не были обнаружены статистически значимые изменения в извлечении белка (ОФ–СЭЖХ);

- Значения рН композиций были стабильны;

- Отсутствовало значимое увеличение количества не видимых невооруженным глазом частиц, и отсутствовали значимые отличия количеств не видимых глазом частиц между композициями в исследовании ДДД.

- При измерении количества не видимых невооруженным глазом частиц методом НІАС все значения были ниже приемлемых пределов, установленных USP <788>, и отсутствовали значимые вариации количеств не видимых глазом частиц между композициями.

- Кроме того, количество не видимых невооруженным глазом частиц также измеряли методом ВМП. Значимые вариации количеств не видимых глазом частиц между композициями отсутствовали.

- Результаты биологического анализа находились в пределах, указанных в спецификации, для всех композиций в процессе хранения.

[0176] Полученные результаты показали, что вариации критических параметров композиции (рН, концентрации мАт1 и концентрации сахарозы) в изучаемых диапазонах не оказывали значимого влияния на стабильность композиции мАт1. Композиция мАт1 с концентрацией 50 мг/мл надежна с точки зрения общих качественных характеристик в протестированном диапазоне составов композиции.

Эффект замораживания и размораживания на стабильность композиций в исследовании ДДД

[0177] Физическая и химическая стабильность 50 мг/мл композиции мАт1, изученная после двух циклов замораживания и размораживания, не менялась при

вариациях критических параметров композиции, то есть, изменении на $\pm 0,3$ единицы рН относительно эталонной композиции мАт1, вариации $\pm 10\%$ в концентрации мАт1 и/или вариации $\pm 20\%$ в концентрации сахарозы.

[0178] Наблюдала следующие эффекты:

- Осадки не были обнаружены ни при визуальной инспекции, ни при измерении мутности (OD при 405 нм);
- Потери белка отсутствовали (ОФ–СЭЖХ);
- Значения рН композиций оставались неизменными;
- Отсутствовали значимые отличия в количествах не видимых невооруженным глазом частиц между исследуемыми композициями при определении счетно–фотометрическим методом (НИАС) или методом визуализации микропотока (ВМП). После 2 циклов З/Р имело место незначительное увеличение количества не видимых невооруженным глазом частиц, которые могли быть удалены путем фильтрования через 0,22–мкм фильтр перед фасовкой ЛП.
- Отсутствовали заметные изменения чистоты при определении методом ЭХ–СЭЖХ во всех композициях после двух циклов замораживания и размораживания.
- Отсутствовали заметные изменения в распределении заряженных вариантов при определении методом ДКИЭФ во всех композициях после двух циклов замораживания и размораживания.
- Результаты биологического анализа показали, что активность мАт1 сохранялась во всех композициях, подвергнутых 2 циклам замораживания и размораживания.

Выводы

[0179] Разработанные на основании дизайна эксперимента (ДЭ) пре–ДДД и ДДД исследования были использованы для оценки эффекта параметров композиции, а также их взаимодействия, на стабильность композиции. В пре–ДДД исследовании в условиях ускоренной деградации и стресса в качестве критических параметров композиции были идентифицированы рН, концентрация мАт1 и концентрация сахарозы. Полное факторное ДДД исследование стабильности при долгосрочном хранении показало, что вариации критических параметров композиции в исследуемых диапазонах не влияли на качество ЛП мАт1.

[0180] В частности, стабильность и активность 50 мг/мл ЛП мАт1, хранящегося при 5°C в течение 12 месяцев, не изменялись при вариации $\pm 10\%$ в концентрации белка, вариации $\pm 20\%$ в концентрации сахарозы, L–пролина и/или гистидина, и/или вариации $\pm 50\%$ в концентрации полисорбата 80, и/или вариации $\pm 0,3$ единицы рН.

[0181] Надежность композиции мАт1 была продемонстрирована в исследовании ДДД. В целом, результаты пре–ДДД и ДДД исследования свидетельствовали о том, что вариации составов композиции мАт1 в изучаемых диапазонах не будут отрицательно влиять на стабильность ЛП мАт1 при хранении в рекомендованных условиях (2–8°C).

[0182] Образцы для изучения ускоренной деградации (FDS) композиции мАт1 с концентрацией 50 мг/мл были стабильны после двух циклов замораживания и

	пика								
	Восстановленны й; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	100	Н/Т	100	Н/Т	
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	
	% Мономера	99,1	99,3	99,3	99,3	99,2	99,2	99,2	
	% НМ	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Анализ заряженных вариантов, КО– СЭЖХ	% Кислых	18,9	18,9	18,9	19,8	20,5	19,8	18,9	
	% Основных	53,5	53,3	53,4	54,7	54,3	54,0	52,9	
	% Щелочных	27,5	27,8	27,7	25,6	25,2	26,2	28,2	
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	33,8	Н/Т	34,3	34,2	Н/Т	34,9	Н/Т	
	% Основных	54,8	Н/Т	54,2	54,3	Н/Т	54,3	Н/Т	
	% Щелочных	11,4	Н/Т	11,4	11,4	Н/Т	10,8	Н/Т	
% Относительной (биоанализ)	эффективности	92	Н/Т	Н/Т	122	Н/Т	112	Н/Т	

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Н/Т, не требуется; ОД, оптическая плотность; ОФ, обращенно–фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Таблица 33: исследование стабильности композиции МАТ1 в условиях ускоренной деградации и стресса

Композиция	50 мг/мл МАТ1, 10 мМ L–гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L–пролин и 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0							
Объем заполнения Контейнер/Крышка	5,5 мл 10–мл стеклянные флаконы типа 1 с 20–мм пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®							
		Хранение при 25°C/60% ОВ (месяцы)			Хранение при 40°C (дни)			
Анализ	0	1	3	6	7	14	28	
Цвет и внешний вид	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	Годе н	
Мутность (Увеличение ОД при 405 нм)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
рН	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
Анализ не видимых глазом частиц, ВМП (#/мл)	2–10 мкм	175	Н/Т	326	2083	Н/Т	Н/Т	288
	≥10 мкм	8	Н/Т	4	109	Н/Т	Н/Т	14
	≥25 мкм	0	Н/Т	3	3	Н/Т	Н/Т	1
% Извлеченного белка, ЭХ–СЭЖХ	100	102	104	101	100	101	102	
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный ; % Основного пика	99,1	Н/Т	Н/Т	98,8	Н/Т	Н/Т	98,6

	Восстановленны й; тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	Н/Т	99,7	Н/Т	Н/Т	99,7
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,3	0,4	0,5	0,6	0,5	0,8	1,2
	% Мономера	99,1	99,1	99,1	99,0	98,7	98,5	98,1
	% НМ	0,6	0,5	0,4	0,4	0,7	0,7	0,7
Анализ заряженных вариантов, КО– СЭЖХ	% Кислых	18,9	19,4	22,1	28,3	20,0	22,0	27,1
	% Основных	53,5	52,7	51,2	48,6	51,9	50,2	46,7
	% Щелочных	27,5	27,9	26,8	23,2	27,1	27,7	26,2
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	33,8	Н/Т	Н/Т	41,9	Н/Т	Н/Т	46,4
	% Основных	54,8	Н/Т	Н/Т	46,5	Н/Т	Н/Т	40,9
	% Щелочных	11,4	Н/Т	Н/Т	11,6	Н/Т	Н/Т	12,7
% Относительной биоанализ	эффективности,	92	Н/Т	Н/Т	91	Н/Т	Н/Т	83

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Н/Т, не требуется; OD, оптическая плотность; ОФ, обращенно–фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Таблица 34: Исследование стабильности композиции мАт1, хранящейся при 2–8°C

Композиция		50 мг/мл мАт1, 10 mM L–гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L–пролин и 0,2% (масс/об) полисорбат 80, pH 6,0							
Объем заполнения		7,44 мл							
Контейнер/Крышка		10–мл стеклянные флаконы типа 1 с 20–мм пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®							
Анализ		Продолжительность хранения при 2–8°C (месяцы)							
		0	1	3	6	9	12	18	24
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи			
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0			
Анализ не видимых глазом частиц, ИАС (N/мл)	≥10 мкм	3	Н/Т	2	4	Н/Т			
	≥25 мкм	0	Н/Т	0	1	Н/Т			
Анализ не видимых глазом частиц, ВМП (N/мл)	2–10 мкм	183	Н/Т	207	1044	Н/Т			
	≥10 мкм	3	Н/Т	7	19	Н/Т			
	≥25 мкм	1	Н/Т	3	5	Н/Т			
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	99	102	102	94			
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	99,2	Н/Т	99,4	99,2	Н/Т			
	Восстановленный ; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	100	100	Н/Т			
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,7	0,6	0,5	0,5	0,6			

	% Мономера	98,8	98,8	98,9	99,0	98,9			
	% НМ	0,6	0,6	0,5	0,4	0,5			
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	21,2	21,2	22,3	19,6	21,5			
	% Основных	52,0	52,1	52,0	51,9	52,0			
	% Щелочных	26,8	26,8	25,7	28,6	26,6			
Анализ заряженных вариантов, ДКИЭФ	% Кислых	34,3	Н/Т	34,7	34,6	Н/Т			
	% Основных	52,1	Н/Т	51,9	51,9	Н/Т			
	% Щелочных	13,7	Н/Т	13,4	13,4	Н/Т			
% Относительной (биоанализ)	эффективности	113	Н/Т	105	128	Н/Т			

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; ДКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Н/Т, не требуется; ОД, оптическая плотность; ОФ, обращенно–фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

Таблица 35: Исследование стабильности композиции МАТ1 в условиях ускоренной деградации и стресса

Композиция		50 мг/мл МАТ1, 10 мМ L–гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L–пролин и 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0						
Объем заполнения		7,44 мл						
Контейнер/Крышка		10–мл стеклянные флаконы типа 1 с 20–мм пробкой 4432/50 из хлорбутилкаучука, покрытой FluroTec®						
		Хранение при 25°C/60% ОВ (месяцы)				Хранение при 40°C (дни)		
Анализ		0	1	3	6	7	14	28
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность (Увеличение ОД при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Анализ не видимых глазом частиц, НИАС (N/мл)	≥10 мкм	3	Н/Т	4	11	Н/Т	Н/Т	5
	≥25 мкм	0	Н/Т	0	2	Н/Т	Н/Т	0
Анализ не видимых глазом частиц, ВМП (#/мл)	2–10 мкм	183	Н/Т	540	1439	Н/Т	Н/Т	799
	≥10 мкм	3	Н/Т	18	16	Н/Т	Н/Т	92
	≥25 мкм	1	Н/Т	1	1	Н/Т	Н/Т	1
% Извлеченного белка, ЭХ–СЭЖХ		100	100	101	101	101	99	100
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный;	99,2	Н/Т	99,3	98,7	Н/Т	Н/Т	98,6
	% Основного пика							
	Восстановленный ; % тяжелой+легкой цепей	100	Н/Т	100	100	Н/Т	Н/Т	99,5
Чистота, СЭЖХ	ЭХ–% ВМ	0,7	0,6	0,7	0,8	0,6	0,8	1,3
	% Мономера	98,8	98,8	98,8	98,7	98,7	98,5	97,9
	% НМ	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8
Анализ заряженных	% Кислых	21,2	21,7	25,3	24,4	20,5	23,2	25,8

вариантов, СЭЖХ	КО-% Основных	52,0	52,1	51,4	50,5	52,4	51,0	49,7
	% Щелочных	26,8	26,2	23,3	25,1	27,0	25,9	24,6
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	34,3	Н/Т	40,0	45,4	Н/Т	Н/Т	46,9
	% Основных	52,1	Н/Т	47,1	43,7	Н/Т	Н/Т	39,7
	% Щелочных	13,7	Н/Т	12,9	11,0	Н/Т	Н/Т	13,3
% Относительной биоанализ	эффективности,	113	Н/Т	143	99	Н/Т	Н/Т	88

КО, катионообменная (хроматография); ЛС, лекарственная субстанция; ВМ, высокомолекулярные; дКИЭФ, динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование, НМ, низкомолекулярные; ВМП, визуализация микропотока; Н/Т, не требуется; OD, оптическая плотность; ОФ, обращенно-фазовая (хроматография); ЭХ, эксклюзионная (хроматография); СЭЖХ, сверхэффективная жидкостная хроматография.

[0185] Было установлено, что две композиции при разных объемах заполнения были стабильны в условиях стресса (40°C/75% ОВ) (данные не представлены).

Пример 16: Стабильность композиции мАт1 в предварительно заполненных шприцах

[0186] В Таблицах 36–38 приведены данные по стабильности высококонцентрированных композиций мАт1 в предварительно заполненных шприцах.

Таблица 36: Исследование стабильности лекарственного продукта мАт1 в предварительно заполненном шприце (ПЗШ), хранящемся при 5°C

Композиция		175 мг/мл мАт1, 10 мМ гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L-пролин, 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0					
Объем заполнения		1,2 мл					
Контейнер/Крышка		2,25-мл стеклянный шприц Nuova Omri EZ Fill с тонкостенной иглой 27G 1/2, закрытой колпачком иглы FM30, и с резиновым поршнем 4023/50, покрытым FluroTec®					
		Продолжительность хранения при 5°C (месяцы)					
Анализ		0	1	3	6	9	12
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Анализ не видимых глазом частиц, ИАС (#/мл)	≥10 мкм	35	Н/Т	17	59	Н/Т	13
	≥25 мкм	0	Н/Т	4	1	Н/Т	1
Анализ частиц, ВМП (частиц/мл)	2–10 мкм	21326	Н/Т	8613	Н/П	Н/Т	Н/П
	≥10 мкм	82	Н/Т	303	Н/П	Н/Т	Н/П
	≥25 мкм	3	Н/Т	2	Н/П	Н/Т	Н/П
% Извлеченного белка, ОФ-СЭЖХ		100	96	97	100	98	100
Чистота, МКЭ-SDS	Не восстановленный; % Основного пика	97,6	Н/Т	Н/Т	97,7	97,1	Н/П
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	99,6	Н/Т	Н/Т	99,8	99,8	Н/П
Чистота, ЭХ-СЭЖХ	% ВМ	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9
	% Нативного	99,1	98,9	99,1	98,7	98,7	98,6
	% НМ	0,3	0,5	0,2	0,5	0,5	0,5
Анализ заряженных вариантов, КО-СЭЖХ	% Кислых	18,6	18,5	18,2	18,6	19,3	18,8
	% Основных	53,4	54,8	54,3	53,2	53,5	55,5
	% Щелочных	27,9	26,8	27,5	25,3	25,6	24,3

Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	30,2	Н/Т	30,2	32,9	Н/Т	Н/П
	% Основных	55,9	Н/Т	55,9	53,4	Н/Т	Н/П
	% Щелочных	13,9	Н/Т	13,9	13,7	Н/Т	Н/П
% Относительной эффективности (биоанализ)		87	Н/Т	Н/Т	141	Н/Т	Н/П

Таблица 37: Исследование стабильности лекарственного продукта МАТ1 в предварительно заполненном шприце (ПЗШ), хранящемся в условиях ускоренной деградации

Композиция		175 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L-пролин, 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН 6,0						
Объем заполнения		1,2 мл						
Контейнер/Крышка		2,25-мл стеклянный шприц Nuova Omri EZ Fill с тонкостенной иглой 27G 1/2, закрытой колпачком иглы FM30, и с резиновым поршнем 4023/50, покрытым FluroTec®						
		Хранение при 25°C/60% ОВ (месяцы)				Хранение при 40°C (дни)		
Анализ		0	1	3	6	7	14	28
Цвет и внешний вид		Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0
Анализ невидимых глазом частиц, ИАС (#/мл)	≥10 мкм	3	Н/Т	13	30	Н/Т	Н/Т	14
	≥25 мкм	1	Н/Т	1	1	Н/Т	Н/Т	3
Анализ частиц, ВМП (частиц/мл)	2-10 мкм	21326	Н/Т	4605	Н/П	Н/Т	Н/Т	3717
	≥10 мкм	82	Н/Т	225	Н/П	Н/Т	Н/Т	51
	≥25 мкм	3	Н/Т	2	Н/П	Н/Т	Н/Т	8
% Извлеченного белка, ОФ-СЭЖХ		100	98	98	100	100	100	98
Чистота, МКЭ-SDS	Не восстановленный; % Основного пика	97,6	Н/Т	97,7	96,5	Н/Т	Н/Т	96,8
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	99,6	Н/Т	99,2	99,7	Н/Т	Н/Т	99,4
Чистота, ЭХ-СЭЖХ	% ВМ	0,6	0,9	1,2	1,6	1,6	2,5	3,9
	% Нативного	99,1	98,6	98,5	97,7	97,8	96,9	95,5
	% НМ	0,3	0,5	0,3	0,6	0,6	0,7	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО-СЭЖХ	% Кислых	18,6	19,0	21,3	25,5	20,0	22,1	24,3
	% Основных	53,4	54,3	52,0	46,5	51,8	49,8	48,9
	% Щелочных	27,9	26,8	26,6	28,1	28,3	28,1	26,8
Анализ заряженных вариантов, дКИЭФ	% Кислых	30,2	Н/Т	36,8	44,9	Н/Т	Н/Т	45,6
	% Основных	55,9	Н/Т	49,6	42,8	Н/Т	Н/Т	40,5
	% Щелочных	13,9	Н/Т	13,6	12,3	Н/Т	Н/Т	13,9
% Относительной эффективности, биоанализ		87	Н/Т	Н/Т	137	Н/Т	Н/Т	83

Таблица 38: Исследование стабильности лекарственного продукта МАТ1 в предварительно заполненном шприце (ПЗШ) – эффект стрессовых условий

Композиция	175 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин, 5% (масс/об) сахара, 1,5% (масс/об) L-пролин, 0,2% (масс/об) полисорбат 80, рН
-------------------	---

		6,0		
Объем заполнения		1,2 мл		
Контейнер/Крышка		2,25–мл стеклянный шприц Nuova Omri EZ Fill с тонкостенной иглой 27G 1/2, закрытой колпачком иглы FM30, и с резиновым поршнем 4023/50, покрытым FluroTec®		
		Перемешивание (мин)		
Анализ		0	60	120
Цвет и внешний вид		Годен	Годен	Годен
Мутность (Увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00
pH		6,0	6,0	6,0
Анализ не видимых глазом частиц, НІАС (#/мл)	≥10 мкм	3	Н/Т	5
	≥25 мкм	1	Н/Т	5
Анализ частиц, ВМП (частиц/мл)	2–10 мкм	21326	Н/Т	13896
	≥10 мкм	82	Н/Т	55
	≥25 мкм	3	Н/Т	3
% Извлеченного белка, ОФ–СЭЖХ		100	100	100
Чистота, МКЭ–SDS	Не восстановленный; % Основного пика	97,6	Н/Т	97,9
	Восстановленный; % тяжелой+легкой цепей	99,6	Н/Т	99,5
Чистота, ЭХ–СЭЖХ	% ВМ	0,6	0,6	0,6
	% Нативного	99,1	98,9	98,8
	% НМ	0,3	0,6	0,6
Анализ заряженных вариантов, КО–СЭЖХ	% Кислых	18,6	18,8	19,0
	% Основных	53,4	53,2	53,5
	% Щелочных	27,9	28,1	27,5
Анализ заряженных вариантов, ДКИЭФ	% Кислых	30,2	Н/Т	30,4
	% Основных	55,9	Н/Т	55,5
	% Щелочных	13,9	Н/Т	14,1
% Относительной биоанализ эффективности,		87	Н/Т	100

Пример 17: Совместимость композиций мАт1 с устройствами для внутривенной (в/в) доставки

[0187] Для оценки совместимости 50 мг/мл композиции мАт1 вносили в 100–мл мешок для в/в введения, содержащий либо 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций, либо 5% раствор декстрозы для инъекций, для оценки того, является ли мАт1 стабильным при внутривенной доставке. С учетом вариабельности массы тела пациентов, в данном исследовании изучали смеси с двумя концентрациями, 1,0 мг/мл мАт1 и 25 мг/мл мАт1, которые отражали условия введения в низкой и высокой дозах. В исследованиях совместимости использовали следующие компоненты смеси для в/в введения:

- Лекарственный продукт
 - 50 мг/мл ЛП мАт1
- Разбавители
 - 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций
 - 5% раствор декстрозы для инъекций
- Мешки для в/в введения
 - Мешки для в/в введения из поливинилхлорида (PVC) с ди(2–

этилгексил)фталатом (DEHP), предварительно заполненные 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций

- Мешки для в/в введения из поливинилхлорида (PVC) с DEHP, предварительно заполненные 5% раствором декстрозы для инъекций

- Мешки для в/в введения из полиолефина (PO), предварительно заполненные 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций

- Мешки для в/в введения из полиолефина (PO), предварительно заполненные 5% раствором декстрозы для инъекций

- Мешки для в/в введения из полипропилена, предварительно заполненные 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций

- Флаконы для в/в введения из полипропилена, предварительно заполненные 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций

- Насосы для в/в введения

- Перистальтический насос

- Беспоршневой насос

- Наборы для в/в инфузии

- Набор для в/в инфузии из PVC с DEHP

- Набор для в/в инфузии из PVC с диоктилтерефталатом (DEHT)

- Набор для в/в инфузии из PVC с триоктилтримеллитатом (TOTM)

- Набор для в/в инфузии из выстланного полиэтиленом PVC

- Набор для в/в инфузии из полиуретана

- Фильтры

- 0,2–мкм полиэфирсульфоновый встроенный фильтр

- 1,2–мкм полиэфирсульфоновый встроенный фильтр

- 5–мкм полиэфирсульфоновый встроенный фильтр

- 15–мкм полиэфирсульфоновый встроенный фильтр.

[0188] ЛП, используемые в данном исследовании, были произведены в соответствии с требованиями GMP с использованием репрезентативного коммерческого производственного процесса для ЛП. Мешки для в/в введения, содержащие смесь, сначала выдерживали в течение 24 часов при 5°C; затем мешки инкубировали в течение по меньшей мере 8 часов при 25°C. После этих инкубаций каждый из наборов для инфузии соединяли с мешком для в/в введения, заправляли смесью и выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем каждую смесь прокачивали через соответствующие наборы для инфузии со скоростями 25 мл/ч и 500 мл/ч.

[0189] Методы, используемые для оценки совместимости смеси: Совместимость смеси мАТ1 с материалами, используемыми в устройстве для в/в доставки, оценивали в следующих анализах:

- Цвет и внешний вид при визуальной инспекции

- pH

- Мутность, измеряемая по увеличению оптической плотности (OD) при 405 нм

- Анализ не видимых невооруженным глазом частиц в смеси счетно-фотометрическим методом (НИАС)

- Концентрация белка мАт1 методом обращенно-фазовой сверхэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-СЭЖХ)

- Чистота методом ЭХ-СЭЖХ

- Анализ заряженных вариантов методом КО-СЭЖХ

- Активность в биологическом анализе: Относительную активность каждого образца определяют с использованием биологического анализа и выражают следующим образом: $(IC_{50} \text{ эталонного образца} / IC_{50} \text{ образца}) * 100\%$. Измеренная активность образцов, изучаемых в отношении стабильности при хранении, должна находиться в пределах от 50% до 150% от измеренной активности эталонного стандарта.

[0190] Результаты и выводы: 50 мг/мл композиция мАт1, разбавленная либо в 0,9% растворе хлорида натрия для инъекций, либо в 5% растворе декстрозы для инъекций, до концентрации либо 1,0 мг/мл, либо 25 мг/мл, была физически и химически стабильна во всех протестированных условиях в предложенных диапазонах доз и условиях введения. Полученные данные приводят к следующим выводам, относящимся к приготовлению доз и в/в введению ЛП мАт1:

- Содержащие 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций и 5% раствор декстрозы для инъекций мешки для в/в введения, выполненные из PVC с ДЕНР, РО и полипропилена, подходят для в/в введения мАт1.

- ЛП мАт1 может быть разбавлен до концентрации вплоть до 1,0 мг/мл в выполненных из PVC, РО или полипропилена мешках для в/в введения, содержащих либо 0,9% раствор хлорида натрия, либо 5% раствор декстрозы для в/в введения.

- ЛП мАт1 может быть разбавлен до концентрации вплоть до 25,0 мг/мл в выполненных из PVC, РО или полипропилена мешках для в/в введения, содержащих либо 0,9% раствор хлорида натрия, либо 5% раствор декстрозы для в/в введения.

- Смесь мАт1 либо в 0,9% растворе хлорида натрия, либо в 5% растворе декстрозы, была стабильна после инкубации в мешках для в/в введения из PVC, РО или полипропилена в течение периодов времени вплоть до 24 часов при 5°C и 8 часов при 25°C. Разбавленный ЛП мАт1 можно вводить в пределах 6 часов после приготовления.

- Разбавленное мАт1 можно вводить с использованием стандартного насоса для инфузий.

- Разбавленное мАт1 можно вводить с использованием набора для инфузий, выполненного из PVC, содержащего ДЕНР, PVC, содержащего ТОТМ, полиэтилена или полиуретана.

- мАт1 совместимо с использованием встроенного 0,2-мкм – 5-мкм полиэфирсульфонового фильтра.

- Разбавленное мАт1 можно вводить со скоростью в диапазоне от 25 до 500 мл/час.

[0191] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные

модификации изобретения, помимо тех, которые описаны в настоящем документе, станут очевидными для специалистов в данной области из приведенного описания и сопроводительных фигур. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая фармацевтическая композиция, содержащая:

(а) антитело, которое специфически связывает человеческий белок программируемой гибели клеток (PD-1), при этом антитело содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), входящие в состав варибельной области тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 1, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), входящие в состав варибельной области легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 2;

(b) буфер, включающий гистидин;

(c) органический растворитель, включающий полисорбат;

(d) стабилизатор, включающий сахар; и

(e) модификатор вязкости, включающий аминокислоту;

при этом композиция имеет pH $6,0 \pm 0,3$.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что концентрация антитела составляет от 5 мг/мл $\pm 0,75$ мг/мл до 250 мг/мл $\pm 37,5$ мг/мл.

3. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация антитела составляет 25 мг/мл $\pm 3,75$ мг/мл.

4. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация антитела составляет 50 мг/мл $\pm 7,5$ мг/мл.

5. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация антитела составляет 150 мг/мл $\pm 22,5$ мг/мл.

6. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация антитела составляет 175 мг/мл $\pm 26,25$ мг/мл.

7. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–6, отличающаяся тем, что концентрация гистидинового буфера составляет от 5 мМ ± 1 мМ до 20 мМ ± 4 мМ.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, отличающаяся тем, что концентрация гистидинового буфера составляет 10 мМ ± 2 мМ.

9. Фармацевтическая композиция по п. 7 или 8, отличающаяся тем, что гистидиновый буфер включает L-гистидин и L-гистидин моногидрохлорид моногидрат.

10. Фармацевтическая композиция по п. 9, отличающаяся тем, что концентрация L-гистидина составляет 4,8 мМ $\pm 0,96$ мМ и концентрация L-гистидина моногидрохлорида моногидрата составляет 5,2 мМ $\pm 1,04$ мМ.

11. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–10, отличающаяся тем, что концентрация полисорбата составляет от 0,01% $\pm 0,005\%$ до 0,5% $\pm 0,25\%$ масс/об.

12. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что концентрация полисорбата составляет 0,1% $\pm 0,05\%$ масс/об.

13. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что концентрация полисорбата составляет 0,2% $\pm 0,1\%$ масс/об.

14. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 11–13, отличающаяся тем, что органический растворитель представляет собой полисорбат 80.

15. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–14, отличающаяся тем, что стабилизатор представляет собой сахарозу, и концентрация сахарозы составляет от 0% до 20% ± 4% масс/об.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, отличающаяся тем, что концентрация сахарозы составляет от 1% ± 0,2% до 10% ± 2% масс/об.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, отличающаяся тем, что концентрация сахарозы составляет 5% ± 1% масс/об.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, отличающаяся тем, что модификатор вязкости представляет собой пролин.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, отличающаяся тем, что концентрация пролина составляет от 0 до 5% ± 1% масс/об.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, отличающаяся тем, что концентрация пролина составляет 1,5% ± 0,3% масс/об.

21. Фармацевтическая композиция по п. 18, содержащая:

- (a) антитело в концентрации 175 мг/мл ± 26,25 мг/мл,
 - (b) гистидиновый буфер в концентрации от 5 мМ ± 1 мМ до 20 мМ ± 4 мМ,
 - (c) полисорбат в концентрации от 0,1% ± 0,05% до 0,5% ± 0,25% масс/об,
 - (d) сахарозу в концентрации от 1% ± 0,2% до 10% ± 2% масс/об, и
 - (e) пролин в концентрации от 1% ± 0,2% до 5% ± 1% масс/об;
- при pH 6,0 ± 0,3.

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, содержащая:

- (a) антитело в концентрации 175 мг/мл ± 26,25 мг/мл,
 - (b) гистидиновый буфер в концентрации 10 мМ ± 2 мМ,
 - (c) полисорбат в концентрации 0,2% ± 0,1% масс/об;
 - (d) сахарозу в концентрации 5% ± 1% масс/об и
 - (e) пролин в концентрации 1,5% ± 0,3% масс/об;
- при pH 6,0 ± 0,3.

23. Фармацевтическая композиция по п. 22, содержащая:

- (a) антитело в концентрации 175 мг/мл ± 26,25 мг/мл,
 - (b) L–гистидин в концентрации 4,8 мМ ± 0,96 мМ,
 - (c) L–гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации 5,2 мМ ± 1,04 мМ,
 - (d) полисорбат в концентрации 0,2% ± 0,1% масс/об,
 - (e) сахарозу в концентрации 5% ± 1% масс/об и
 - (f) пролин в концентрации 1,5% ± 0,3% масс/об;
- при pH 6,0 ± 0,3.

24. Фармацевтическая композиция по п. 18, содержащая:

- (a) антитело в концентрации 150 мг/мл ± 22,5 мг/мл,
- (b) гистидиновый буфер в концентрации от 5 мМ ± 1 мМ до 20 мМ ± 4 мМ,
- (c) полисорбат в концентрации от 0,1% ± 0,05% до 0,5% ± 0,25% масс/об,
- (d) сахарозу в концентрации от 1% ± 0,2% до 10% ± 2% масс/об и

(е) пролин в концентрации от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ масс/об;
при рН $6,0 \pm 0,3$.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, содержащая:

- (а) антитело в концентрации $150 \text{ мг/мл} \pm 22,5 \text{ мг/мл}$,
- (б) гистидиновый буфер в концентрации $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$,
- (с) полисорбат в концентрации $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об,
- (д) сахарозу в концентрации $5\% \pm 1\%$ масс/об и
- (е) пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об,
при рН $6,0 \pm 0,3$.

26. Фармацевтическая композиция по п. 25, содержащая:

- (а) антитело в концентрации $150 \text{ мг/мл} \pm 22,5 \text{ мг/мл}$,
- (б) L–гистидин в концентрации $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$,
- (с) L–гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$,
- (д) полисорбат в концентрации $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об,
- (е) сахарозу в концентрации $5\% + 1\%$ масс/об и
- (ф) пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об;
при рН $6,0 \pm 0,3$.

27. Фармацевтическая композиция по п. 18, содержащая:

- (а) антитело в концентрации $50 \text{ мг/мл} \pm 7,5 \text{ мг/мл}$,
- (б) гистидиновый буфер в концентрации от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $20 \text{ мМ} \pm 4 \text{ мМ}$,
- (с) полисорбат в концентрации от $0,1\% \pm 0,05\%$ до $0,5\% \pm 0,25\%$ масс/об,
- (д) сахарозу в концентрации от $1\% \pm 0,2\%$ до $10\% \pm 2\%$ масс/об и
- (е) пролин в концентрации от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ масс/об,
при рН $6,0 \pm 0,3$.

28. Фармацевтическая композиция по п. 27, содержащая:

- (а) антитело в концентрации $50 \text{ мг/мл} \pm 7,5 \text{ мг/мл}$,
- (б) гистидиновый буфер в концентрации $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$,
- (с) полисорбат в концентрации $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об,
- (д) сахарозу в концентрации $5\% \pm 1\%$ масс/об и
- (е) пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об,
при рН $6,0 \pm 0,3$.

29. Фармацевтическая композиция по п. 28, содержащая:

- (а) антитело в концентрации $50 \text{ мг/мл} \pm 7,5 \text{ мг/мл}$,
- (б) L–гистидин в концентрации $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$,
- (с) L–гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$,
- (д) полисорбат в концентрации $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об,
- (е) сахарозу в концентрации $5\% \pm 1\%$ масс/об, и
- (ф) пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об;
при рН $6,0 \pm 0,3$.

30. Фармацевтическая композиция по п. 18, содержащая:

- (a) антитело в концентрации $25 \text{ мг/мл} \pm 3,75 \text{ мг/мл}$,
 - (b) гистидиновый буфер в концентрации от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $20 \text{ мМ} \pm 4 \text{ мМ}$,
 - (c) полисорбат в концентрации от $0,1\% \pm 0,05\%$ до $0,5\% \pm 0,25\%$ масс/об;
 - (d) сахарозу в концентрации от $1\% \pm 0,2\%$ до $10\% \pm 2\%$ масс/об и
 - (e) пролин в концентрации от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ масс/об,
- при pH $6,0 \pm 0,3$.

31. Фармацевтическая композиция по п. 30, содержащая:

- (a) антитело в концентрации $25 \text{ мг/мл} \pm 3,75 \text{ мг/мл}$,
 - (b) гистидиновый буфер в концентрации $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$,
 - (c) полисорбат в концентрации $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об,
 - (d) сахарозу в концентрации $5\% \pm 1\%$ масс/об и
 - (e) пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об,
- при pH $6,0 \pm 0,3$.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, содержащая:

- (a) антитело в концентрации $25 \text{ мг/мл} \pm 3,75 \text{ мг/мл}$,
 - (b) L-гистидин в концентрации $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$,
 - (c) L-гистидин моногидрохлорид моногидрат в концентрации $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$,
 - (d) полисорбат в концентрации $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об,
 - (e) сахарозу в концентрации $5\% \pm 1\%$ масс/об и
 - (f) пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об;
- при pH $6,0 \pm 0,3$.

33. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–32, имеющая вязкость менее 20 сП.

34. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–33, отличающаяся тем, что по меньшей мере 90% антител имеют нативную конформацию через 28 дней при 45°C .

35. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–34, отличающаяся тем, что по меньшей мере 35% антител представляют собой основной заряженный вариант антитела через 28 дней при 45°C .

36. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–35, отличающаяся тем, что по меньшей мере 94% антител имеют нативную конформацию через три месяца при 25°C .

37. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–36, отличающаяся тем, что по меньшей мере 44% антител представляют собой основной заряженный вариант антитела через три месяца при 25°C .

38. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–37, отличающаяся тем, что по меньшей мере 96% антител имеют нативную конформацию через 12 месяцев при 5°C .

39. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–38, отличающаяся тем, что по меньшей мере 45% антитела представляет собой основной заряженный вариант антитела через 12 месяцев при 5°C .

40. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–39, отличающаяся тем, что по меньшей мере 96% антител имеют нативную конформацию через 12 месяцев при –

20°C, -30°C и/или -80°C.

41. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–40, отличающаяся тем, что по меньшей мере 40% антител представляют собой основной заряженный вариант антитела через 12 месяцев при -20°C, -30°C и/или -80°C.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) 175 мг/мл \pm 26,25 мг/мл антитела, которое специфически связывает PD-1, при этом антитело содержит HCVR с SEQ ID NO: 1 и LCVR с SEQ ID NO: 2,

(b) 10 мМ \pm 2 мМ гистидинового буфера, pH 6,0 \pm 0,3,

(c) 0,2% \pm 0,1% масс/об полисорбата 80,

(d) 5% \pm 1% масс/об сахарозы и

(e) 1,5% \pm 0,3% масс/об пролина; при этом:

(i) \geq 90% антител имеют молекулярную массу 143 кДа \pm 1 кДа;

(ii) фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 20 сП; и

(iii) по меньшей мере 97% или более антител имеют нативную конформацию при хранении при -80°C, -30°C и/или -20°C в течение 6 месяцев.

43. Фармацевтическая композиция по п. 42, состоящая из: (a) 175 мг/мл \pm 26,25 мг/мл антитела, (b) 4,8 мМ \pm 0,96 мМ L-гистидина (c) 5,2 мМ \pm 1,04 мМ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата, (d) 0,2% \pm 0,1% масс/об полисорбата 80, (e) 5% \pm 1% масс/об сахарозы и (f) 1,5% \pm 0,3% масс/об пролина, в воде при pH 6,0 \pm 0,3.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) 150 мг/мл \pm 22,5 мг/мл антитела, которое специфически связывает PD-1, при этом антитело содержит HCVR с SEQ ID NO: 1 и LCVR с SEQ ID NO: 2,

(b) 10 мМ \pm 2 мМ гистидинового буфера, pH 6 \pm 0,3,

(c) 0,2% \pm 0,1% масс/об полисорбата 80,

(d) 5% \pm 1% масс/об сахарозы; и

(e) 1,5% \pm 0,3% масс/об пролина; при этом:

(i) \geq 90% антител имеют молекулярную массу 143 кДа \pm 1 кДа;

(ii) фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 15 сП; и

(iii) по меньшей мере 97% или более антител имеют нативную конформацию при хранении при -80°C, -30°C или -20°C в течение 6 месяцев.

45. Фармацевтическая композиция по п. 44, состоящая из: (a) 150 мг/мл \pm 22,5 мг/мл антитела, (b) 4,8 мМ \pm 0,96 мМ L-гистидина, (c) 5,2 мМ \pm 1,04 мМ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата, (d) 0,2% \pm 0,1% масс/об полисорбата 80, (e) 5% \pm 1% масс/об сахарозы и (f) 1,5% \pm 0,3% масс/об пролина, в воде при pH 6,0 \pm 0,3.

46. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) 50 мг/мл \pm 7,5 мг/мл антитела, которое специфически связывает PD-1, при этом антитело содержит HCVR с SEQ ID NO: 1 и LCVR с SEQ ID NO: 2,

(b) 10 мМ \pm 2 мМ гистидинового буфера, pH 6 \pm 0,3,

(c) 0,2% \pm 0,1% масс/об полисорбата 80,

(d) 1,5% \pm 0,3% масс/об пролина, и

(е) $5\% \pm 1\%$ масс/об сахарозы; при этом:

(i) $\geq 90\%$ антител имеют молекулярную массу $143 \text{ кДа} \pm 1 \text{ кДа}$;

(ii) более 96% антител имеют нативную конформацию при хранении в течение 12 месяцев при 5°C ; и

(iii) фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 15 сП.

47. Фармацевтическая композиция по п. 46, состоящая из: (а) $50 \text{ мг/мл} \pm 7,5 \text{ мг/мл}$ антитела, (b) $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ L-гистидина, (с) $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата, (d) $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об полисорбата 80, (е) $5\% \pm 1\%$ масс/об сахарозы; и (f) $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об пролина, в воде при $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$.

48. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(а) $25 \text{ мг/мл} \pm 3,75 \text{ мг/мл}$ антитела, которое специфически связывает PD-1, при этом антитело содержит HCVR с SEQ ID NO: 1 и LCVR с SEQ ID NO: 2,

(b) $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$ гистидинового буфера, $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$,

(с) $0,2\% \pm 0,1\%$ масс/об полисорбата 80,

(d) $5\% \pm 1\%$ масс/об сахарозы; и

(е) $1,5\% \pm 0,3\%$ масс/об пролина; при этом:

(а) $\geq 90\%$ антител имеют молекулярную массу $143 \text{ кДа} \pm 1 \text{ кДа}$;

(b) фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 10 сП; и

(с) по меньшей мере 96% антител имеют нативную конформацию при хранении в течение 12 месяцев при 5°C .

49. Фармацевтическая композиция по п. 48, состоящая из: (а) $25 \text{ мг/мл} \pm 3,75 \text{ мг/мл}$ антитела, (b) $4,8 \text{ мМ} \pm 0,96 \text{ мМ}$ L-гистидина, (с) $5,2 \text{ мМ} \pm 1,04 \text{ мМ}$ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата, (d) $0,2\% \text{ масс/об} \pm 0,1\%$ полисорбата 80, (е) $5\% \text{ масс/об} \pm 1\%$ сахарозы и (f) $1,5\% \text{ масс/об} \pm 0,3\%$ пролина, в воде при $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$.

50. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–49, при этом антитело содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 4, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8.

51. Фармацевтическая композиция по п. 50, в которой антитело содержит HCVR с SEQ ID NO: 1 и LCVR с SEQ ID NO: 2.

52. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит HCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

53. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит LCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

54. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит HCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и LCVR, имеющую 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

55. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 11.

56. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело

содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

57. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

58. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

59. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9/10 и 11/10.

60. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9/10.

61. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–51, в которой антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11/10.

62. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1–61, отличающаяся тем, что композиция содержится в контейнере.

63. Фармацевтическая композиция по п. 62, где контейнер представляет собой флакон.

64. Фармацевтическая композиция по п. 63, где флакон представляет собой 10–мл прозрачный стеклянный флакон типа 1.

65. Фармацевтическая композиция по п. 62, где контейнер представляет собой шприц.

66. Фармацевтическая композиция по п. 65, где шприц выполнен из стекла с низким содержанием вольфрама.

67. Фармацевтическая композиция по п. 62, в где контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц.

68. Фармацевтическая композиция по п. 62, содержащаяся в автоинжекторе.

69. Набор, включающий фармацевтическую композицию по любому из п.п. 1–61, контейнер и инструкции.

70. Набор по п. 69, в котором контейнер представляет собой стеклянный флакон.

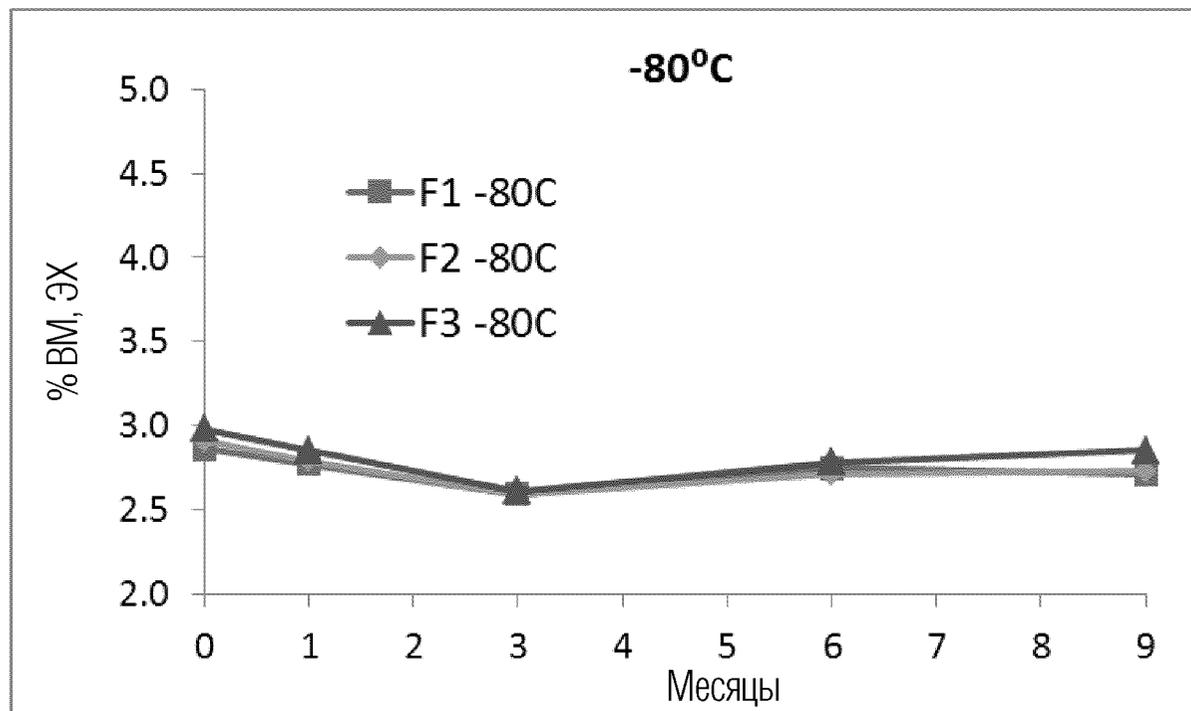
71. Набор по п. 69, в котором контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц.

72. Набор по п. 69, в котором контейнер представляет собой автоинжектор.

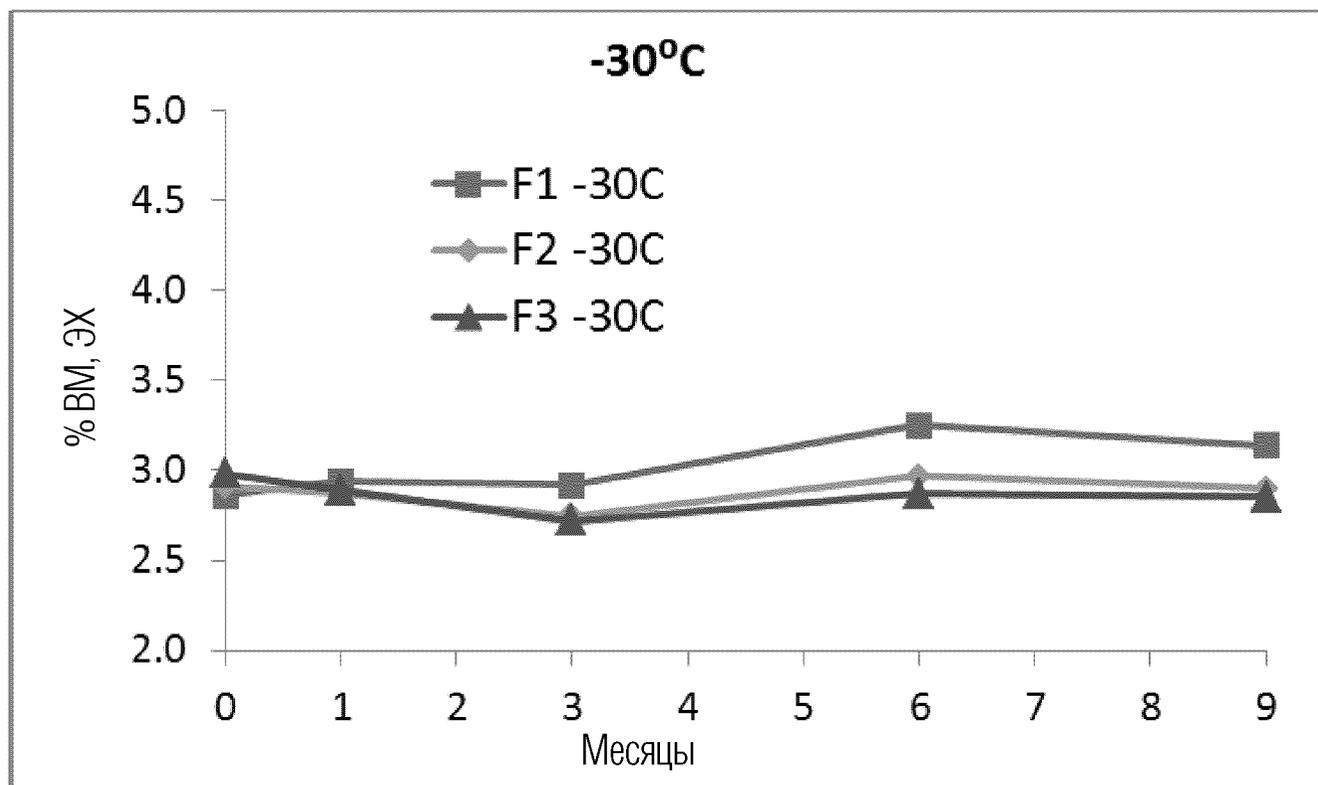
По доверенности

Композиция		150 мг/мл МАТ1, 10 мМ гистидин									
Объем заполнения		0,4 мл									
Контейнер/Крышка		2-мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой 4432/50 из бутилкаучука, покрытой FluroTec®									
Экципиенты	рН	Цвет и внешний вид	Мутность (Увеличение OD при 405 нм)	рН	% Извлеченного МАТ1, ОФ-СЭЖХ	Чистота, ЭХ-СЭЖХ			Заряженные варианты, КО-СЭЖХ		
						% ВМ	% Нативного	% НМ	% Кислых	% Основных	% Щелочных
Исходный материал ^{a1)}	-	Годен	0.00	-	100	3.4	96.1	0.5	26.2	48.9	24.9
-	5.3	Не годен	Образец желированный								
	5.6	Не годен	Образец желированный								
	5.9	Не годен	0.40	5.8	95	49.3	49.9	0.8	32.5	39.1	28.4
	6.0	Не годен	0.51	6.0	99	44.1	55.0	0.9	36.9	41.9	21.3
	6.4	Не годен	0.65	6.3	98	38.1	61.0	0.9	45.9	34.8	19.4
9% сахараза	5.3	Годен	0.14	5.3	95	46.9	52.4	0.7	33.7	37.6	28.6
	5.5	Годен	0.16	5.5	99	34.9	64.2	0.9	35.7	36.3	28.0
	5.9	Годен	0.13	5.8	100	25.5	73.6	1.0	36.0	37.2	26.8
	6.0	Годен	0.14	6.0	99	21.9	77.1	1.0	40.0	34.5	25.5
	6.4	Годен	0.15	6.3	98	19.6	79.4	1.0	48.9	26.7	24.4
5% сахараза, 70 мМ Аргинин	5.4	Не годен	Образец желированный								
	5.6	Не годен	Образец желированный								
	5.9	Не годен	Образец желированный								
	6.0	Не годен	Образец желированный								
	6.4	Не годен	0.46	6.3	100	45.8	53.1	1.0	46.6	31.1	22.3

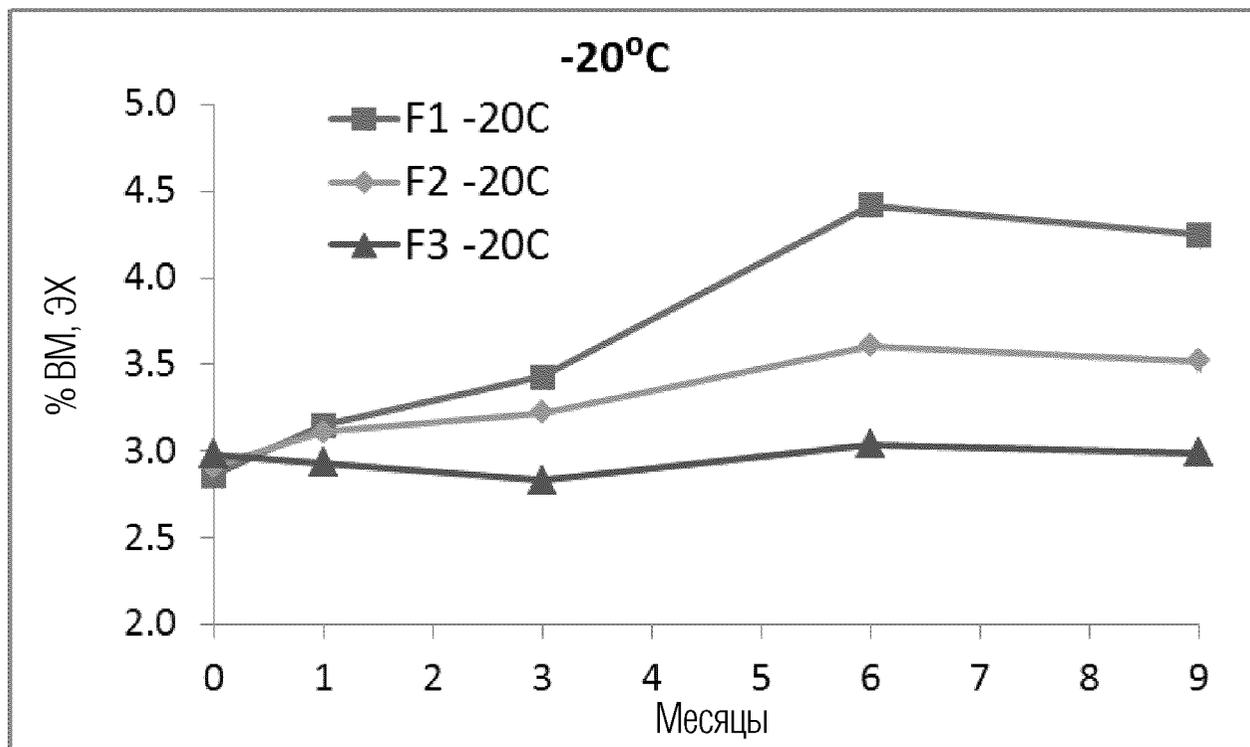
ФИГ. 1



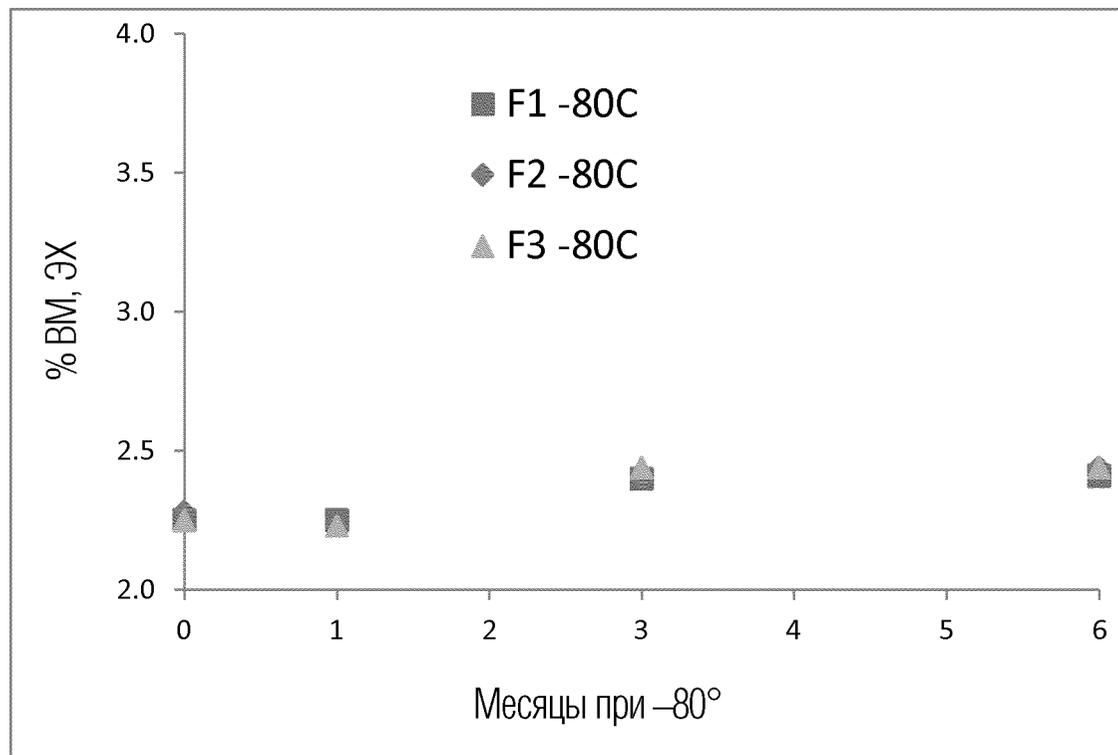
ФИГ. 2А



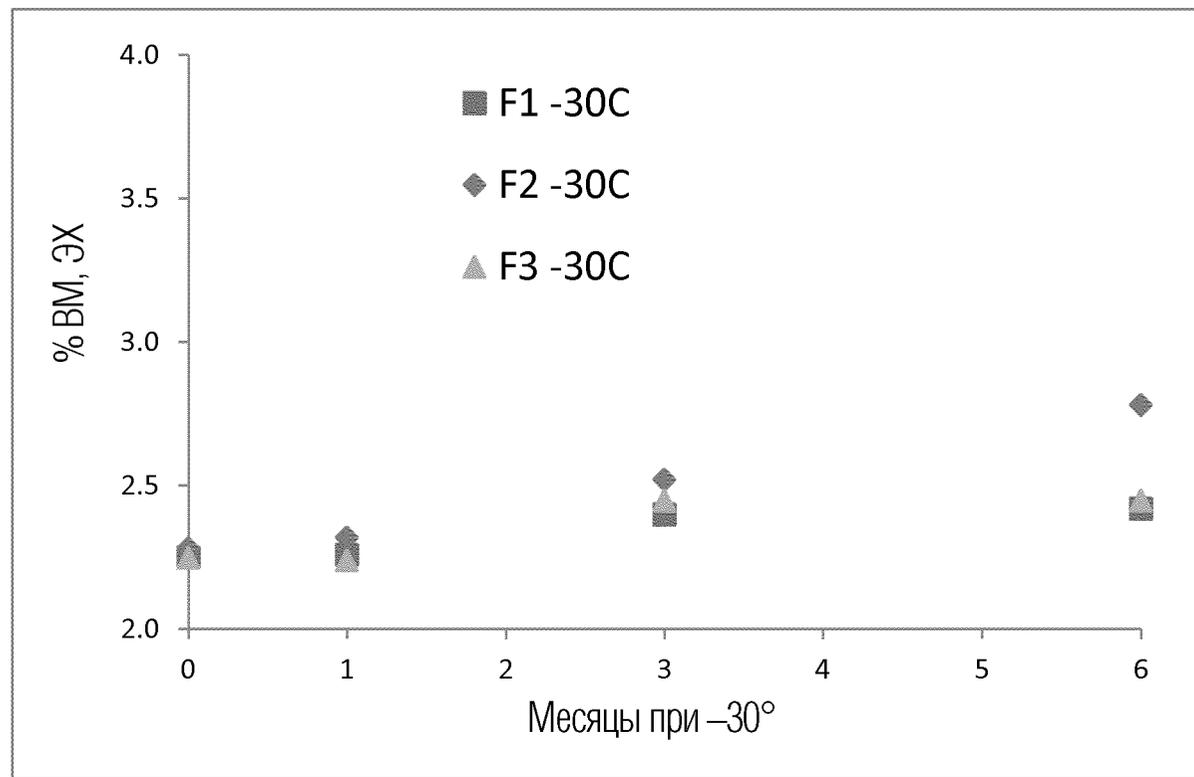
ФИГ. 2В



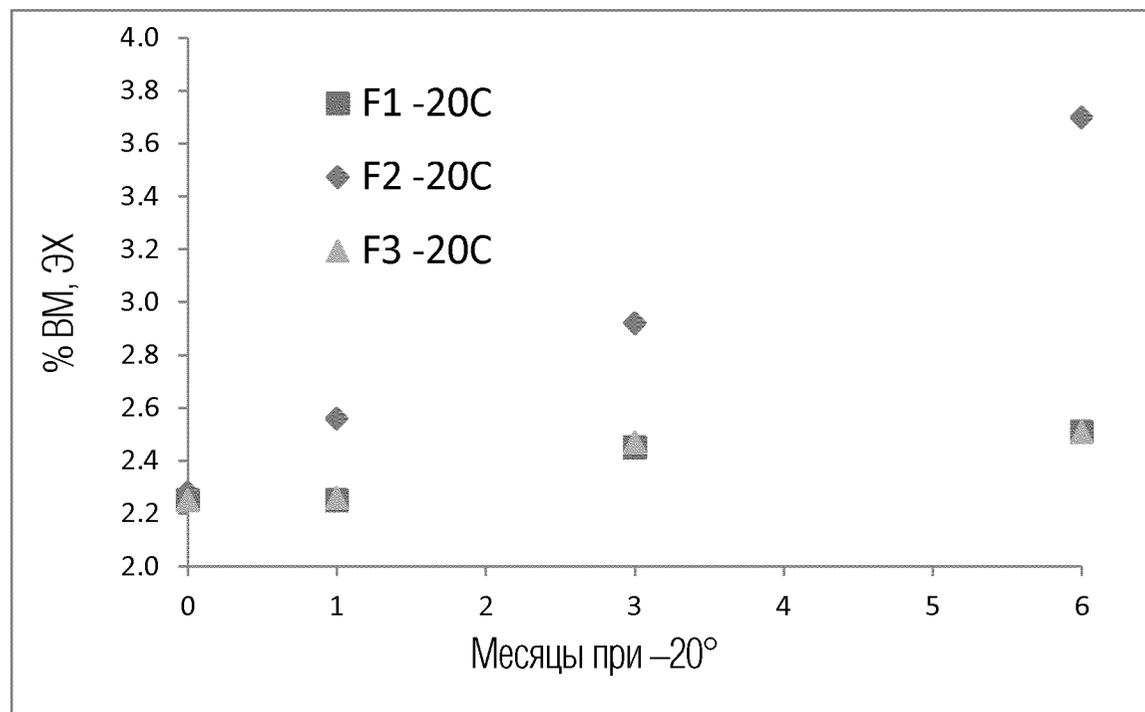
ФИГ. 2С



ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

Композиция	Компоненты композиции									Вязкость (20°C)
	RG2810 (мг/мл)	Гистидин (мм)	pH	Сахароза (%)	Пролин (%)	NaCl (мм)	Mg(OAc) ₂ (мм)	Arg-HCl (мм)	ПС-80	
1	150	10	6.0	9.0						10.6
2	150	10	6.0	5.0				70.0		8.0
3	150	10	6.0	5.0		70.0				7.4
4	150	10	6.0	5.0			25.0			7.9
5	150	10	6.0	5.0	2.0					9.6
6	150	10	6.0		3.5					8.3
7	150	10	6.0		2.0			70.0		7.1
8	150	10	6.0		2.0	70.0				7.2
9	150	10	6.0		2.0		25.0			7.2
10	150	10	6.0	9		0	0	0	0.1	11.0
11	150	10	6.0	9		25			0.1	10.0
12	150	10	6.0	9		50			0.1	10.2
13	150	10	6.0	9		75			0.1	9.4
14	150	10	6.0	9		100			0.1	9.7
15	150	25	6.0	9					0.1	10.6
16	150	50	6.0	9					0.1	10.3
17	150	75	6.0	9					0.1	10.1
18	150	100	6.0	9					0.1	9.8
19	150	10	6.0	9			10		0.1	10.8
20	150	10	6.0	9			25		0.1	10.3
21	150	10	6.0	9			50		0.1	9.9
22	150	10	6.0	9				25	0.1	10.0
23	150	10	6.0	9				50	0.1	9.9
24	150	10	6.0	9				70	0.1	10.0

ФИГ. 4

Formulation		175 mg/mL mAb1, 10 mM Histidine (except F9 with 25 mM), 0.1% polysorbate 80									
Fill Volume		0.4 mL									
Container/Closure		2 mL Type 1 borosilicate glass vial with a FluroTec® coated 4432/50 butyl rubber stopper									
Excipients	Formulation No.	Color and Appearance	Turbidity (Increase in OD at 405 nm)	pH	% mAb1 Recovered by RP-UPLC	Purity by SE-UPLC			Charged Variants by CEX-UPLC		
						% HMW	% Native	% LMW	% Acidic	% Main	% Basic
Starting Material ^{a1)}	-	Pass	0.00	6.1	100	2.3	97.1	0.6	26.1	46.8	27.1
-	F1	Pass	0.20	6.1	72	51.4	48.0	0.6	28.1	44.9	27.0
9% sucrose	F2	Pass	0.08	6.1	94	26.6	72.6	0.8	30.0	42.9	27.1
5% sucrose, 1.5% Proline	F3	Pass	0.06	6.1	93	31.1	68.1	0.7	30.2	43.5	26.3
5% sucrose, 3.0% Proline	F4	Pass	0.07	6.1	93	28.9	70.3	0.8	30.4	43.3	26.3
3.0% Proline	F5	Pass	0.16	6.1	88	45.5	53.9	0.6	28.7	41.9	29.4
5% sucrose, 1.5% Proline 25 mM Arginine	F6	Pass	0.13	6.1	94	39.5	59.8	0.7	28.2	41.5	30.3
5% sucrose, 1.5% Proline 25 mM Mg(OAc) ₂	F7	Pass	0.15	6.2	91	41.1	58.1	0.8	32.7	35.5	31.8
5% sucrose, 1.5% Proline 25 mM NaCl	F8	Pass	0.16	6.1	84	40.4	58.9	0.7	28.7	42.0	29.3
5% sucrose, 1.5% Proline 25 mM Histidine	F9	Pass	0.13	6.1	90	40.0	59.2	0.7	28.9	43.8	27.3

6/6

ФИГ. 5