

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992526** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.13

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.01

(54) СТАБИЛЬНЫЕ СОСТАВЫ АНТИ-СТЛА4 АНТИТЕЛ, ОТДЕЛЬНО И В КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА 1 ПРОГРАММИРУЕМОЙ СМЕРТИ (PD-1), И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/500,268

(32) 2017.05.02

(33) US

(86) PCT/US2018/030420

(87) WO 2018/204343 2018.11.08

(71) Заявитель:

МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)

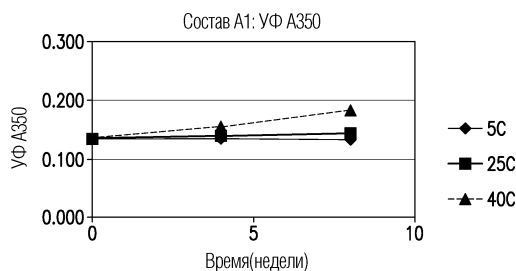
(72) Изобретатель:

Бхаттачарья Суменду, Де Арнаб,
Нарасимхан Чакраварти Начу,
Шарма Манодж К., Ян Сяоюй,
Берлейдж Руби, Чеунг Джейсон К.
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к стабильным составам, содержащим антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ассоциированным с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигеном 4 (CTLA4), необязательно дополнительно содержащим антитело против рецептора 1 программируемой смерти (PD-1) или его антигенсвязывающий фрагмент. Настоящее изобретение относится также к способам лечения различных злокачественных опухолей и хронических инфекций с использованием составов по изобретению.



A

A1

201992526

201992526

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-559523EA/011

СТАБИЛЬНЫЕ СОСТАВЫ АНТИ-СТЛА4 АНТИТЕЛ, ОТДЕЛЬНО И В КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА 1 ПРОГРАММИРУЕМОЙ СМЕРТИ (PD-1), И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к составам терапевтических антител и к их применению для лечения различных нарушений. В одном аспекте изобретение относится к составам, содержащим антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ассоциированным с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигеном 4 (CTLA4). В другом аспекте такой состав дополнительно содержит антитело против рецептора 1 программируемой смерти (PD-1) или его антигенсвязывающий фрагмент. Настоящее изобретение относится также к способам лечения различных злокачественных опухолей и хронических инфекций с использованием составов, описанных в настоящем описании.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет по заявке U.S.S.N. 62/500268, поданной 2 мая 2017 г., полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРИНЯТЫЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ ФОРМЕ

Список последовательностей настоящей заявки принят в электронной форме через EFS-Web как список последовательностей в формате ASCII, с наименованием файла «24449WOPCT-SEQTXT-30APR2018.TXT», датой создания 30 апреля 2018 г. и размером 96 кб. Этот список последовательностей, принятый через EFS-Web, является частью описания, и его полное содержание приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лекарственные средства на основе антител для использования у человека могут несколько отличаться по аминокислотной последовательности их константных доменов, или по их каркасным последовательностям внутри вариабельных доменов, однако, они, как правило, наиболее существенно отличаются по последовательностям CDR. Даже антитела, связывающие один и тот же белок, один и тот же полипептид или даже, потенциально, один и тот же эпитоп, могут содержать полностью различные последовательности CDR. Терапевтические антитела для использования у человека можно также получать из зародышевой последовательности антитела человека или из зародышевых последовательностей из не относящихся к человеку (например, грызунов) антител, например, как в гуманизированных антителах, что приводит к дополнительному разнообразию потенциальных последовательностей CDR. Эти различия последовательности приводят к различной стабильности в растворе и к различной способности реагировать на параметры раствора. Кроме того, небольшие изменения в аранжировке аминокислот или изменения в одном или нескольких остатках аминокислот

могут приводить к очень сильно отличающейся стабильности антитела и его чувствительности к путям специфической для последовательности деградации. Следовательно, в настоящее время не является возможным прогнозировать условия раствора, необходимые для оптимизации стабильности антитела. Каждое антитело необходимо исследовать индивидуально для определения оптимального состава раствора. Bhambhani et al. (2012) J. Pharm. Sci. 101:1120.

Антитела также представляют собой относительно высокомолекулярные белки (~150000 Да), например, по сравнению с другими терапевтическими белками, такими как гормоны и цитокины. Следовательно, часто является необходимым дозирование с относительно высокими весовыми количествами лекарственных средств на основе антител для достижения желательных молярных концентраций лекарственного средства. Кроме того, часто является желательным подкожное введение лекарственных средств на основе антител, поскольку это позволяет самостоятельное введение. Самостоятельное введение исключает затрату времени и средств, связанную с посещением медицинского учреждения для введения, например, внутривенно. Подкожная доставка ограничена объемом раствора, который можно доставлять в участок инъекции в однократной инъекции, который, как правило, составляет приблизительно 1-1,5 мл. Подкожное самостоятельное введение, как правило, осуществляют с использованием предварительно заполненного шприца или автоинжектора, заполненного жидким раствором состава лекарственного средства, а не лиофилизированной формой, чтобы избежать необходимости для пациента ресуспендировать лекарственное средство перед инъекцией. Лекарственные средства на основе антител должны быть стабильными во время хранения для гарантии эффективности и постоянства дозирования, таким образом, важно, чтобы любой выбранный состав сохранял желательные свойства, такие как высокая концентрация, прозрачность и приемлемая вязкость, и чтобы он также сохранял эти свойства и эффективность лекарственного средства на протяжении достаточно длительного срока хранения в обычных условиях хранения.

CTLA4 имеет очень близкое родство с молекулой CD28 по структуре гена, хромосомной локализации, гомологи последовательности и экспрессии гена. Оба из них являются рецепторами костимулирующей молекулы B7, в основном экспрессированной на поверхности активированных Т-клеток. После связывания с B7, CTLA4 может ингибировать активацию Т-клеток мыши и человека, играя роль в отрицательной регуляции активации Т-клеток.

Анти-CTLA4 mAb или лиганды CTLA4 могут предотвращать связывание CTLA4 с его природными лигандами, таким образом, блокируя передачу посредством CTLA4 сигнала отрицательной регуляции Т-клетки и усиливая способность Т-клеток отвечать на различные антигены. В этом аспекте, результаты исследований *in vivo* и *in vitro* по существу согласуются. В настоящее время, некоторые анти-CTLA4 mAb тестируют в клинических исследованиях для лечения рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени, злокачественной

меланомы и т.д. (Grosso *et al.*, CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun.* 13:5 (2013)).

В качестве важных факторов, влияющих на функцию Т-клеток, CTLA4 и анти-CTLA4 mAb могут оказывать специфический терапевтический эффект на заболевания посредством создания помех для иммунного микроокружения в организме. Они имеют высокую эффективность и восполняют недостаточность традиционных лекарственных средств, открывая новый путь генотерапии. CTLA4 и mAb против CTLA4 тестируют в экспериментах и на различных стадиях клинических исследований. Например, при аутоиммунных заболеваниях, они эффективно ингибировали гиперчувствительность дыхательных путей в модели астмы на животных, предотвращали развитие ревматических заболеваний, опосредовали иммунную толерантность к аллотрансплантату в организме и т.п. С другой стороны, несмотря на то, что для биологической генотерапии не показано какого-либо неблагоприятного эффекта в кратковременных клинических исследованиях, следует уделять внимание потенциальному эффекту после долгосрочного введения. Например, избыточное блокирование передачи сигналов CTLA4-B7 посредством mAb против CTLA4 может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний. Поскольку антитела могут специфически связывать свои антигены и индуцировать лизис клеток-мишеней или блокировать прогрессирование патологии, разработка и применение лекарственных средств на основе антител, особенно, гуманизированных антител, имеют важное значение в клиническом лечении злокачественных опухолей и других иммунных заболеваний у человека.

Известно, что PD-1 играет важную роль в иммунной регуляции и поддержании периферической толерантности. PD-1 умеренно экспрессируется на нативных Т-, В- и NKT-клетках, и подвергается повышающей регуляции посредством передачи сигналов Т/В-клеточных рецепторов на лимфоцитах, моноцитах и миелоидных клетках (Sharpe *et al.*, The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology* (2007); 8:239-245). Предположили, что эффективность антител против PD-1 можно увеличивать при введении в комбинации с другими одобренными или экспериментальными способами терапии злокачественных опухолей, например, радиоактивным облучением, хирургией, химиотерапевтическими средствами, способами направленной терапии, средствами, ингибирующими другие пути передачи сигналов, регуляция которых нарушена в опухолях, и другими усиливающими иммунитет средствами. Одним из таких средств, которые тестировали в комбинации с антагонистами PD-1, является ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4 (кратко обозначенный CTLA4).

Существует необходимость в стабильных составах анти-CTLA4 антител для фармацевтического применения, например, для лечения различных злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний, так же как в стабильных составах анти-CTLA4 антител, в совместном составе с анти-PD-1 антителами человека. Предпочтительно, такие составы могут иметь длительный срок хранения, являться стабильными при хранении и

транспортировке, и могут, предпочтительно, сохранять стабильность в течение от нескольких месяцев до нескольких лет в условиях, типичных для хранения лекарственных средств для самостоятельного введения, т.е. при температуре холодильника в шприце, что приводит к длительному сроку хранения соответствующего продукта лекарственного средства.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте изобретение относится к составу анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащему (i) анти-CTLA4 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент; (ii) буфер, (iii) невосстанавливающий сахар; (iv) неионное поверхностно-активное вещество; и антиоксидант. В другом варианте осуществления, состав дополнительно содержит анти-PD-1 антитело, например, пембролизумаб или ниволумаб. В одном варианте осуществления, состав дополнительно содержит хелатирующий агент.

В одном варианте осуществления, состав содержит (i) от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (ii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ буфера; (iii) от приблизительно 6% до приблизительно 8% по массе/объему (масс./об.) невосстанавливающего сахара; (iv) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% неионного поверхностно-активного вещества; и (v) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ антиоксиданта. В другом варианте осуществления, состав дополнительно содержит анти-PD-1 антитело, например, пембролизумаб или ниволумаб. В другом варианте осуществления, состав дополнительно содержит хелатирующий агент. В одном варианте осуществления хелатирующий агент присутствует в количестве от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 50 мкМ. Хелатирующий агент представляет собой DTPA. В одном варианте осуществления, состав имеет pH между 4,5-6,5. В конкретных вариантах осуществления, pH состава составляет от приблизительно pH 5,0 до приблизительно pH 6,0. В следующем варианте осуществления, pH состава составляет от приблизительно pH 5,3 до приблизительно pH 5,8. В другом варианте осуществления, pH составляет 5,3. В другом варианте осуществления, pH составляет 5,4. В одном варианте осуществления, pH составляет 5,5. В одном варианте осуществления, pH составляет 5,6. В следующем варианте осуществления, pH составляет 5,7. В одном варианте осуществления, pH составляет 5,8.

В одном варианте осуществления состава, буфер представляет собой L-гистидиновый буфер или буфер ацетат натрия, невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, и антиоксидант представляет собой метионин или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления, антиоксидант представляет собой L-метионин. В другом варианте осуществления, антиоксидант представляет собой фармацевтически приемлемую соль L-метионина, например, такую как метионин HCl.

В другом варианте осуществления, состав содержит (i) от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (ii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ L-гистидинового буфера или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ ацетата натрия; (iii) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс./об. сахарозы; (iv) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% масс./об. полисорбата 80; и (v) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ L-метионина. В другом варианте осуществления, состав дополнительно содержит анти-PD-1 антитело, например, пембролизумаб или ниволумаб. В одном варианте осуществления, состав дополнительно содержит хелатирующий агент. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент присутствует в количестве от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 50 мкМ. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ДТРА. В одном варианте осуществления, буфер представляет собой L-гистидиновый буфер. В одном варианте осуществления, состав содержит от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ L-гистидинового буфера. В другом варианте осуществления, состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина. В следующем варианте осуществления, состав содержит полисорбат 80 в массовой доле приблизительно 0,02% масс./об. В одном варианте осуществления, состав анти-CTLA4 антитела содержит сахарозу в массовой доле приблизительно 7% (масс./об.).

В вариантах осуществления состава, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 10 мг/мл, 12,5 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 75 мг/мл или 100 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 25 мг/мл. В дополнительном варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 50 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 75 мг/мл. В следующем варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 100 мг/мл.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к составу, содержащему приблизительно 25 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к составу, содержащему приблизительно 50 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к составу, содержащему приблизительно 75 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, 10 mM L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 mM L-метионина.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к составу, содержащему приблизительно 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, 10 mM L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 mM L-метионина.

В одном аспекте любого из вышеуказанных составов, состав имеет pH приблизительно 5,3-5,8. В другом аспекте состав имеет pH от приблизительно 5,5 до приблизительно 5,6. В другом аспекте, состав имеет pH приблизительно 5,5. В другом аспекте состав имеет pH приблизительно 5,6.

В одном аспекте любого из вышеуказанных составов, состав содержит анти-PD1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном аспекте, анти-PD1 антитело представляет собой пембролизумаб. В другом аспекте, анти-PD1 антитело представляет собой ниволумаб.

В другом аспекте, состав может дополнительно содержать хелатирующий агент. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ДТРА. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ЭДТА. В одном аспекте, хелатирующий агент присутствует в количестве от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 50 мкМ. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 5 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 10 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 15 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 20 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 25 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 30 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 35 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 40 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 45 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, состав содержит приблизительно 50 мкМ хелатирующего агента. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ДТРА, присутствующую в любом из количества, указанных выше. В другом варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ЭДТА, присутствующую в любом из количеств, указанных выше.

В одном варианте осуществления, состав содержится в стеклянном флаконе. В другом варианте осуществления, состав содержится в устройстве для инъекций. В другом варианте осуществления, состав представляет собой жидкий состав. В одном аспекте состав является замороженным при по меньшей мере ниже -70°C . В другом варианте

осуществления, состав представляет собой раствор, восстановленный из лиофилизированного состава.

В конкретных вариантах осуществления, состав является стабильным при температуре холодильника (2-8°C) в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно, 6 месяцев, и более предпочтительно, 1 года, и даже более предпочтительно, вплоть до 2 лет. В одном варианте осуществления состава, через 12 месяцев при 5°C % мономера анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 90\%$, как определено посредством эксклюзионной хроматографии. В другом варианте осуществления состава, через 12 месяцев при 5°C % мономера анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 95\%$, как определено посредством эксклюзионной хроматографии. В другом варианте осуществления состава, через 12 месяцев при 5°C % тяжелой цепи и легкой цепи анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 90\%$, как определено посредством восстанавливающего CE-SDS. В другом варианте осуществления состава, через 12 месяцев при 5°C % тяжелой цепи и легкой цепи анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 95\%$, как определено посредством восстанавливающего CE-SDS. В другом варианте осуществления состава, через 12 месяцев при 5°C % интактного IgG анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 90\%$, как определено посредством невосстанавливающего CE-SDS. В другом варианте осуществления состава, через 12 месяцев при 5°C % интактного IgG анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 95\%$, как определено посредством невосстанавливающего CE-SDS.

В одном аспекте любого из составов, описанных выше, состав содержит анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, где CDR легкой цепи содержат CDRL1 с SEQ ID NO:38, CDRL2 с SEQ ID NO:39, CDRL3 с SEQ ID NO:40, и CDR тяжелой цепи содержат CDRH1 с SEQ ID NO:35, CDRH2 с SEQ ID NO:36 и CDHR3 из SEQ ID NO:37. В другом аспекте состав содержит анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:88, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48. В другом аспекте, состав содержит анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:99, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:100.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к совместному составу анти-CTLA4 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента и антитела против PD-1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащему (i) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; (ii) анти-PD-1 антитело человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, (iii) буфер, (iv) невосстанавливающий сахар; (v) неионное поверхностно-активное вещество; и антиоксидант. В одном варианте осуществления, совместный состав дополнительно содержит хелатирующий агент. В одном варианте осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТА. В другом варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ДТРА. В одном варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 1:2. В другом варианте осуществления совместного

состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 1:1. В следующем варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 2:1. В другом варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 10:1. В следующем варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 1:10. В другом варианте осуществления, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 8:1. В следующем варианте осуществления, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 8:3.

В одном варианте осуществления изобретения, совместный состав содержит (i) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (ii) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл антитела против PD-1 человека (ii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ буфера; (iii) от приблизительно 6% до приблизительно 8% по массе/объему (масс./об.) невосстанавливающего сахара; (iv) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% неионного поверхностно-активного вещества; и (v) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ антиоксиданта. В одном варианте осуществления, совместный состав дополнительно содержит хелатирующий агент. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой DTPA. В одном варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 1:2. В другом варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 1:1. В следующем варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 2:1. В другом варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 10:1. В следующем варианте осуществления совместного состава, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 1:10. В другом варианте осуществления, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 8:1. В следующем варианте осуществления, соотношение антитела против PD-1 человека к антителу против CTLA4 составляет 8:3. В одном варианте осуществления, совместный состав имеет pH между 4,5 и 6,5. В других вариантах осуществления, pH состава составляет от приблизительно pH 5,0 до приблизительно pH 6,0. В следующем варианте осуществления, pH состава составляет от приблизительно pH 5,3 до приблизительно pH 5,8.

В одном варианте осуществления совместного состава, буфер представляет собой буфер гистидин или буфер ацетат натрия, невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, и антиоксидант представляет собой метионин или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления, антиоксидант представляет собой L-метионин. В другом

варианте осуществления, антиоксидант представляет собой фармацевтически приемлемую соль L-метионина, например, такую как метионин HCl.

В другом аспекте совместный состав содержит (i) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (ii) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл антитела против PD-1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента; (iii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ L-гистидинового буфера или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ буфера ацетата натрия; (iv) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс./об. сахарозы; (v) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% масс./об. полисорбата 80; и (vi) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ L-метионина. В одном варианте осуществления, совместный состав дополнительно содержит хелатирующий агент. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой DTPA. В одном варианте осуществления, буфер представляет собой L-гистидиновый буфер. В одном варианте осуществления, совместный состав содержит L-гистидиновый буфер от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ. В другом варианте осуществления, совместный состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина. В следующем варианте осуществления, совместный состав содержит полисорбат 80 в массовой доле приблизительно 0,02% масс./об. В одном варианте осуществления, совместный состав содержит сахарозу в массовой доле приблизительно 7% (масс./об.).

В вариантах осуществления совместного состава, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 10 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 1,25 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 2,5 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 5 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 12,5 мг/мл. В следующем варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 25 мг/мл. В следующем варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 50 мг/мл. В другом варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент составляет 75 мг/мл. В другом варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 100 мг/мл. В дополнительном варианте осуществления, концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет

В одном варианте осуществления, совместный состав содержит приблизительно 21,1 мг/мл анти-PD1 антитела, приблизительно 7,9 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 mM L-

гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

В одном аспекте любого из составов, описанных выше, состав содержит анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, где CDR легкой цепи содержат CDRL1 с SEQ ID NO:38, CDRL2 с SEQ ID NO:39, CDRL3 с SEQ ID NO:40, и CDR тяжелой цепи содержат CDRH1 с SEQ ID NO:35, CDRH2 с SEQ ID NO:36 и CDHR3 из SEQ ID NO:37. В другом аспекте состав содержит анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:88, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48. В другом аспекте состав содержит анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:99, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:100. В одном аспекте любого из составов, описанных выше, анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, где CDR легкой цепи содержат CDRL1 с SEQ ID NO:1, CDRL2 с SEQ ID NO:2, CDRL3 с SEQ ID NO:3, и CDR тяжелой цепи содержат CDRH1 с SEQ ID NO:6, CDRH2 с SEQ ID NO:7 и CDHR3 из SEQ ID NO:8. В другом аспекте составы содержат анти-PD1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:9. В другом аспекте составы содержат анти-PD1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:5, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:10. В одном аспекте любого из составов, описанных выше, анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой пембролизумаб. В другом аспекте анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ниволумаб.

В одном аспекте любого из совместных составов, описанных выше, состав содержит (i) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, где CDR легкой цепи содержат CDRL1 с SEQ ID NO:38, CDRL2 с SEQ ID NO:39, CDRL3 с SEQ ID NO:40, и CDR тяжелой цепи содержат CDRH1 с SEQ ID NO:35, CDRH2 с SEQ ID NO:36 и CDHR3 из SEQ ID NO:37, и (ii) анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, где CDR легкой цепи содержат CDRL1 с SEQ ID NO:1, CDRL2 с SEQ ID NO:2, CDRL3 с SEQ ID NO:3, и CDR тяжелой цепи содержат CDRH1 с SEQ ID NO:6, CDRH2 с SEQ ID NO:7 и CDHR3 из SEQ ID NO:8.

В одном аспекте любого из совместных составов, описанных выше, состав содержит (i) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:88, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48 и (ii) анти-PD1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи,

содержащую SEQ ID NO:4, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:9.

В другом аспекте любого из совместных составов, описанных выше, состав содержит (i) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:99, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:100, и (ii) анти-PD1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:5, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:10.

В одном варианте осуществления, состав содержится в стеклянном флаконе. В другом варианте осуществления, состав содержится в устройстве для инъекций. В другом варианте осуществления, состав представляет собой жидкий состав. В одном аспекте состав является замороженным при по меньшей мере ниже -70°C . В другом варианте осуществления, состав представляет собой раствор, восстановленный из лиофилизированного состава.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения хронической инфекции или злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего (например, человека), включающим: введение эффективного количества состава анти-CTLA4 антитела или совместного состава, указанного в настоящем описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГУРЕ 1А показана оптическая плотность в УФ А350 состава А1 при 5° , 25° и 40°C на протяжении 8 недель. На ФИГУРЕ 1В показана оптическая плотность в УФ А350 состава А2 при 5° , 25° , и 40°C , на протяжении 8 недель.

На ФИГУРЕ 2 показана оптическая плотность в УФ А350 составов А1 и А2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 3А и 3В показаны данные %НМВ, как определено посредством UP-SEC, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5° , 25° и 40°C , для составов А1 и А2, соответственно.

На ФИГУРЕ 4А и 4В показаны данные % мономера, как определено посредством UP-SEC, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5° , 25° и 40°C , для составов А1 и А2, соответственно.

На ФИГУРЕ 5 показан %НМВ, как определено посредством UP-SEC, для составов А1 и А2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 6 показан % мономера, как определено посредством UP-SEC, для составов А1 и А2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 7А и 7В показаны данные % кислого пика, как определено посредством НР-ІЕХ, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5° , 25° и 40°C , для составов А1 и А2, соответственно.

На ФИГУРЕ 8А и 8В показаны данные % основного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5°, 25° и 40°С, для составов А1 и А2, соответственно.

На ФИГУРЕ 9А и 9В показаны данные % главного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5°, 25° и 40°С, для составов А1 и А2, соответственно.

На ФИГУРЕ 10 показан % кислого пика, как определено посредством НР-ІЕХ, для составов А1 и А2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 11 показан % основного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, для составов А1 и А2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 12 показан % главного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, для составов А1 и А2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 13 показан процент окисления LC-M4 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования, для составов А1 и А2.

На ФИГУРЕ 14 показан процент окисления HC-M34 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования, для составов А1 и А2.

На ФИГУРЕ 15 показан процент окисления HC-M250 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования, для составов А1 и А2.

На ФИГУРЕ 16 показан процент окисления HC-M426 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования, для составов А1 и А2.

На ФИГУРЕ 17А показана оптическая плотность в УФ А350 состава В1 при 5°, 25° и 40°С, на протяжении 8 недель. На ФИГУРЕ 17В показана оптическая плотность в УФ А350 состава В2 при 5°, 25° и 40°С, на протяжении 8 недель.

На ФИГУРЕ 18 показана оптическая плотность в УФ А350 составов В1 и В2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 19А и 19В показаны данные %НМW, как определено посредством UP-SEC, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5°, 25° и 40°С, для составов В1 и В2, соответственно.

На ФИГУРЕ 20А и 20В показаны данные % мономера, как определено посредством UP-SEC, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5°, 25° и 40°С, для составов В1 и В2, соответственно.

На ФИГУРЕ 21 показан %НМW, как определено посредством UP-SEC, для составов В1 и В2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 22 показан % мономера, как определено посредством UP-SEC, для составов В1 и В2, при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 23А и 23В показаны данные % кислого пика, как определено посредством НР-ІЕХ, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5°, 25° и 40°С, для составов В1 и В2, соответственно.

На ФИГУРЕ 24А и 24В показаны данные % основного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5°, 25° и 40°С, для составов В1 и В2, соответственно.

На ФИГУРЕ 25А и 25В показаны данные % главного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, в зависимости от времени, в условиях хранения при 5°, 25° и 40°С, для составов В1 и В2, соответственно.

На ФИГУРЕ 26 показан % кислого пика, как определено посредством НР-ІЕХ, для составов В1 и В2 при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 27 показан % основного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, для составов В1 и В2 при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 28 показан % главного пика, как определено посредством НР-ІЕХ, для составов В1 и В2 при исследованиях стресса при замораживании-размораживании, стресса при встряхивании и светового стресса.

На ФИГУРЕ 29 показан процент окисления LC-M4 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования для составов В1 и В2.

На ФИГУРЕ 30 показан процент окисления HC-M34 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования для составов В1 и В2.

На ФИГУРЕ 31 показан процент окисления HC-M250 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования для составов В1 и В2.

На ФИГУРЕ 32 показан процент окисления HC-M426 (окисления метионина), как определено посредством пептидного картирования для составов В1 и В2.

На ФИГУРЕ 33 показаны данные КД для совместных составов, показывающие, что составы являются стабильными при трех различных значениях рН (5,0, 5,5 и 6,0).

На ФИГУРЕ 34 показаны аминокислотные последовательности тяжелой и легких цепей ипилиумаба (SEQ ID NO:84 и 85, соответственно).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте изобретение относится к составам, содержащим анти-CTLA4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащим метионин. Настоящее изобретение относится также к совместным составам анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и антитела против PD-1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащим метионин. В каждом случае, состав и совместный состав, необязательно, содержит хелатирующий агент.

I. Определение и сокращенные обозначения

Как используют на протяжении описания и прилагаемой формулы изобретения, приняты следующие сокращенные обозначения:

API активный фармацевтический ингредиент

CDR определяющая комплементарность область в переменных областях иммуноглобулина, определенная с использованием системы нумерации Kabat, если не указано иное

СНО яичники китайского хомяка

CI доверительный интервал

CTLA4 ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4

DTPA диэтилентриаминпентауксусная кислота

EC50 концентрация, приводящая к 50% эффективности или связыванию

ELISA твердофазный иммуноферментный анализ

FFPE фиксированный формалином, погруженный в парафин

FR каркасная область

HRP пероксидаза хрена

HNSCC плоскоклеточная карцинома головы и шеи

IC50 концентрация, приводящая к 50% ингибированию

IgG иммуноглобулин G

ICH Международная конференция по гармонизации требований к государственной регистрации лекарственных средств

IHC иммуногистохимия или иммуногистохимический

mAb моноклональное антитело

MES 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

NCBI Национальный центр биотехнологической информации

NSCLC немелкоклеточный рак легкого

ПЦР полимеразная цепная реакция

PD-1 белок программируемой смерти 1 (называемый также белок-1 программируемой клеточной смерти и рецептор 1 программируемой смерти)

PD-L1 лиганд 1 рецептора 1 программируемой клеточной смерти

PD-L2 лиганд 2 рецептора 1 программируемой клеточной смерти

PS80 полисорбат 80

TNBC трижды отрицательный рак молочной железы

V_H переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина

V_K переменная область легкой цепи каппа иммуноглобулина

V_L переменная область легкой цепи иммуноглобулина

об./об. объем на объем

WFI вода для инъекций

масс./об. масса на объем

Чтобы изобретение можно было легче понять, определенные технические и научные термины конкретно определены ниже. Если конкретно не определено иное в другом месте этого описания, все другие технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится это изобретение.

Как используют на протяжении описания и прилагаемой формулы изобретения, неконкретизированные и конкретизированные формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иного.

Ссылка на «или» обозначает любую или обе возможности, если контекст явно не требует одной из указанных возможностей. В некоторых случаях, «и/или» используют для выделения любой или обеих возможностей.

«Лечить» или «лечение» злокачественной опухоли, в рамках изобретения, обозначает введение состава по изобретению субъекту, который имеет иммунное состояние или злокачественное состояние, или у которого диагностирована злокачественная опухоль или патогенная инфекция (например, вирусная, бактериальная, грибковая), для достижения по меньшей мере одного положительного терапевтического эффекта, например, такого как уменьшение количества клеток злокачественных опухолей, уменьшение размера опухоли, уменьшение скорости инфильтрации злокачественных клеток в периферические органы, или уменьшение скорости метастазирования опухоли или роста опухоли. «Лечение» может включать одно или несколько из следующего: индукции/увеличения противоопухолевого иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа на патоген, токсин и/или собственный антиген, стимуляции иммунного ответа на вирусную инфекцию, уменьшения количества одного или нескольких маркеров опухолей, ингибирования роста или выживаемости клеток опухолей, уничтожения или уменьшения размера одного или нескольких злокачественных очагов или опухолей, уменьшения уровня одного или нескольких маркеров опухолей, облегчения, уменьшения тяжести или длительности злокачественной опухоли, продления выживаемости пациента относительно ожидаемой выживаемости для сходного не подвергаемого лечению пациента.

«Иммунное состояние» или «иммунное нарушение» включает, например, патологическое воспаление, воспалительное нарушение и аутоиммунное нарушение или заболевание. «Иммунное состояние» также относится к инфекции, персистирующей инфекции и пролиферативным состояниям, таким как злокачественная опухоль, опухоли и ангиогенез, включая инфекции, опухоли и злокачественные опухоли, устойчивые к уничтожению иммунной системой. «Злокачественное состояние» включает, например, злокачественную опухоль, клетки злокачественных опухолей, опухоли, ангиогенез и предзлокачественные состояния, такие как дисплазия.

Положительные терапевтические эффекты при злокачественной опухоли можно измерять рядом способов (См., W. A. Weber, *J. Nucl. Med.* 50:1S-10S (2009)). Например, применительно к ингибированию роста опухоли, в соответствии со стандартами NCI, T/C $\leq 42\%$ представляет собой минимальный уровень противоопухолевой активности. T/C <

10% считают высоким уровнем противоопухолевой активности, где $T/C (\%) = \text{медиана объема опухоли после лечения} / \text{медиана объема опухоли в контроле} \times 100$. В некоторых вариантах осуществления, лечение, достигнутое посредством введения состава по изобретению, представляет собой любое из выживаемости без прогрессирования (PFS), свободной от заболевания выживаемости (DFS) или общей выживаемости (OS). PFS, также обозначаемая как «время до прогрессирования опухоли», показывает длительность времени во время и после лечения, в которое злокачественная опухоль не растет, и включает количество времени, которое пациенты испытывают полный ответ или частичный ответ, так же как количество времени, которое пациенты испытывают стабильное заболевание. DFS относится к длительности времени во время и после лечения, которое пациент остается свободным от заболевания. OS относится к продлению ожидаемой продолжительности жизни, по сравнению с наивными или не подвергаемыми лечению индивидуумами или пациентами. В то время как вариант осуществления составов, способов лечения и применений по настоящему изобретению может не являться эффективным для достижения положительного терапевтического эффекта у каждого пациента, он должен являться эффективным для статистически значимого количества субъектов, как определено посредством любого статистического теста, известного в данной области, такого как t-критерий Стьюдента, критерий χ^2 , U-критерий согласно Манну и Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера-Терпстры и критерий Уилкоксона.

Термин «пациент» (альтернативно обозначаемый как «субъект» или «индивидуум» в настоящем описании) относится к млекопитающему (например, крысе, мыши, собаке, кошке, кролику), которого можно лечить с использованием составов по изобретению, наиболее предпочтительно, человеку. В некоторых вариантах осуществления, пациент представляет собой взрослого пациента. В других вариантах осуществления, пациент представляет собой пациента детского возраста.

Термин «антитело» относится к любой форме антитела, обладающей желательной биологической активностью. Таким образом, он использован в самом широком смысле и конкретно включает, но без ограничения, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, гуманизированные, полностью человеческие антитела и химерные антитела. «Исходные антитела» представляют собой антитела, полученные посредством подвергания иммунной системы воздействию антигена, до модификации антител для намеченного использования, например, гуманизации антитела для использования в качестве человеческого терапевтического антитела.

Как правило, основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственных за узнавание антигена. Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь формируют

связывающий участок антитела. Таким образом, как правило, интактное антитело имеет два связывающих участка. Карбокси-концевая часть тяжелой цепи может определять константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. Как правило, человеческие легкие цепи классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, человеческие тяжелые цепи, как правило, классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Внутри легких и тяжелых цепей, переменные и константные области соединены посредством области «J» из приблизительно 12 или более аминокислот, где тяжелая цепь включает также область «D» из приблизительно 10 и более аминокислот. См. в общем, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989).

Как правило, переменные домены как тяжелых, так и легких цепей, содержат три гиперпеременные области, называемые также определяющими комплементарность областями (CDR), локализованные внутри относительно консервативных каркасных областей (FR). CDR обычно выровнены посредством каркасных областей, что позволяет их связывание со специфическим эпитопом. Как правило, от N-конца до C-конца, переменные домены как легких, так и тяжелых цепей, содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Приписывание аминокислоты каждому домену осуществляют, как правило, в соответствии с определениями из Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md. ; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) *J Mol. Biol.* 196:901-917 или Chothia, *et al.*, (1989) *Nature* 342:878-883.

Антитело, которое «специфически связывается с» указанным белком-мишенью, представляет собой антитело, для которого показано предпочтительное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считают «специфическим» для наметенной для него мишени, если его связывание является определяющим присутствия белка-мишени в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительные. Антитела или их связывающие фрагменты, которые можно использовать по настоящему изобретению, могут связываться с белком-мишенью с аффинностью, по меньшей мере в два раза большей, предпочтительно, по меньшей мере в десять раз большей, более предпочтительно, по меньшей мере в 20 раз большей, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере в 100 раз большей, чем аффинность для нецелевых белков. В рамках изобретения, говорят, что антитело специфически связывается с полипептидом, содержащим данную аминокислотную последовательность, например, аминокислотную последовательность молекулы зрелого CTLA4 человека или PD-1 человека, если оно связывается с полипептидами, содержащим эту последовательность, но не связывается с белками, лишенными этой последовательности.

«Химерное антитело» относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителе, происходящем из конкретного вида (например, человека) или принадлежащем к

конкретному классу или подклассу антитела, в то время как остальная часть цепи(цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителе, происходящем из другого вида (например, мыши) или принадлежащем к другому классу или подклассу антитела, так же как к фрагментам таких антител, при условии, что они имеют желательную биологическую активность.

«Введенные в совместный состав» или «совместный состав», или «получение совместного состава», или «составленные совместно», в рамках изобретения, относится по меньшей мере к двум различным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые составляют совместно и хранят в форме комбинированного продукта в одном флаконе или сосуде (например, устройстве для инъекции), вместо того, чтобы составлять и хранить индивидуально и затем смешивать перед введением или вводить отдельно. В одном варианте осуществления, совместный состав содержит два различных антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

Термин «фармацевтически эффективное количество» или «эффективное количество» обозначает количество, на основании которого достаточно терапевтической композиции или состава вводят пациенту для лечения заболевания или состояния. Специалисту в данной области известно, что этот уровень можно менять в соответствии с такими характеристиками пациента, как возраст, масса и т.д.

Термин «приблизительно», при определении количества (например, mM, или M) вещества или композиции, процента (об./об. или масс./об.) компонента состава, pH раствора/состава или значения параметра, характеризующего стадию способа, или т.п. относится к варианту числового количества, который может возникнуть, например, в ходе типичных способов измерения, манипуляций и отбора образцов, включенных в получение, характеризацию и/или использование вещества или композиции; из-за экспериментальной ошибки в этих способах; из-за различий в изготовлении, источнике или чистоте ингредиентов, используемых для получения или использования композиций или осуществления способов; и т.п. В конкретных вариантах осуществления, «приблизительно» может обозначать изменение на $\pm 0,1\%$, $0,5\%$, 1% , 2% , 3% , 4% , 5% или 10% .

В рамках изобретения, «х% (масс./об.)» является эквивалентным х г/100 мл (например, 5% масс./об. эквивалентно 50 мг/мл).

Составы по настоящему изобретению включают антитела и их фрагменты, которые являются биологически активными после разведения или в жидкой форме.

Термины «злокачественная опухоль», «раковый» или «злокачественный» обозначают или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры злокачественных опухолей включают, но без ограничения, карциному, лимфому, лейкоз, бластоми и саркому. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают плоскоклеточную карциному, миелому, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, желудочно-кишечную злокачественную опухоль (злокачественную опухоль желудочно-кишечного

тракта), рак почки, рак яичника, рак печени, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, меланому, хондросаркому, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, злокачественную опухоль мозга, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному ободочной кишки и рак головы и шеи.

«Chothia» обозначает систему нумерации антител, описанную в Al-Lazikani *et al.*, *JMB* 273:927-948 (1997).

«Kabat», в рамках изобретения обозначает систему выравнивания и нумерации иммуноглобулинов, впервые представленную в Elvin A. Kabat ((1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.).

«Ингибирующее рост средство», в рамках изобретения, относится к соединению или композиции, которые ингибируют рост клетки, особенно, злокачественной клетки, экспрессирующей любой из генов, идентифицированных в настоящем описании, либо *in vitro* или *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство представляет собой средство, которое значительно уменьшает процент клеток со сверхэкспрессией таких генов в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, блокирующие прохождение клеточного цикла (в точке, отличной от S-фазы), такие как средства, индуцирующие арест в G1-фазе и арест в M-фазе. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин и этопозид. Средства, осуществляющие арест в G1-фазе, также распространяются на арест в S-фазе, например, алкилирующие ДНК средства, такие как декарбазин, мехлорэтамин и цисплатин. Дополнительную информацию можно обнаружить в *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled «Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs» by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995).

Термины «связывающий CTLA4 фрагмент», «его антигенсвязывающий фрагмент», «его связывающий фрагмент» или «его фрагмент» включают фрагмент или производное антитела, которые еще по существу сохраняют его биологическую активность связывания антигена (CTLA4 человека) и ингибирования его активности (например, блокирования связывания CTLA4 человека с его нативными лигандами). Таким образом, термин «фрагмент антитела» или связывающий CTLA4 фрагмент относится к части полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающей или вариабельной области. Примеры фрагментов анти-CTLA4 антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv. Как правило, связывающий фрагмент или производное сохраняет по меньшей мере 10% его активности ингибирования CTLA4. В некоторых вариантах осуществления, связывающий фрагмент или производное сохраняет по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% (или более) его активности ингибирования CTLA4, хотя можно использовать любой связывающий фрагмент с достаточной аффинностью, чтобы

оказывать желательный биологический эффект. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент связывается со своим антигеном с аффинностью, по меньшей мере в два раза большей, предпочтительно, по меньшей мере в десять раз большей, более предпочтительно, по меньшей мере в 20 раз большей, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере в 100 раз большей, чем аффинность для неродственных антигенов. В одном варианте осуществления антитело имеет аффинность, превышающую приблизительно 10^9 литров/моль, как определено, например, посредством анализа Скэтчарда. Munsen *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239. Предусмотрено также, чтобы связывающий CTLA4 фрагмент мог включать варианты, имеющие консервативные аминокислотные замены, по существу не изменяющие его биологическую активность.

Термины «связывающий PD-1 фрагмент», «его антигенсвязывающий фрагмент», «его связывающий фрагмент» или «его фрагмент» включают фрагмент или производное антитела, которые еще по существу сохраняют его биологическую активность связывания антигена (PD-1 человека) и ингибирования его активности (например, блокирования связывания PD-1 с PDL1 и PDL2). Таким образом, термин «фрагмент антитела» или связывающий PD-1 фрагмент относится к части полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающей или вариабельной области. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv. Как правило, связывающий фрагмент или производное сохраняет по меньшей мере 10% его активности ингибирования PD-1. В некоторых вариантах осуществления, связывающий фрагмент или производное сохраняет по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% (или более) его активности ингибирования PD-1, хотя можно использовать любой связывающий фрагмент с достаточной аффинностью, чтобы оказывать желательный биологический эффект. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент связывается со своим антигеном с аффинностью, по меньшей мере в два раза большей, предпочтительно, по меньшей мере в десять раз большей, более предпочтительно, по меньшей мере в 20 раз большей, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере в 100 раз большей, чем аффинность для неродственных антигенов. В одном варианте осуществления антитело имеет аффинность, превышающую приблизительно 10^9 литров/моль, как определено, например, посредством анализа Скэтчарда. Munsen *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239. Предусмотрено также, чтобы связывающий PD-1 фрагмент мог включать варианты, имеющие консервативные аминокислотные замены, по существу не изменяющие его биологическую активность.

«Человеческое антитело» относится к антителу, содержащему белковые последовательности только человеческого иммуноглобулина. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если продуцировано у мыши, в клетке мыши или в гибридоме, происходящей из клетки мыши. Подобным образом, «мышинное антитело» или «крысиное антитело» относятся к антителу, содержащему последовательности только мышинного или крысиного иммуноглобулина, соответственно.

«Гуманизированное антитело» относится к формам антител, содержащим последовательности из не относящихся к человеку (например, мышинных) антител, так же как из человеческих антител. Такие антитела содержат минимальную последовательность, происходящую из не относящегося к человеку иммуноглобулина. Как правило, гуманизированное антитело может содержать по существу все из по меньшей мере одного, и как правило, двух, переменных доменов, в которых все или в основном все из гиперпеременных петель соответствуют гиперпеременным петлям из не относящегося к человеку иммуноглобулина, и все или в основном все из областей FR представляют собой области из последовательностей иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также может, необязательно, содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, из иммуноглобулина человека. Гуманизированные формы антител грызунов могут, как правило, содержать такие же последовательности CDR из исходных антител грызунов, хотя определенные аминокислотные замены можно включать для увеличения аффинности, увеличения стабильности гуманизированного антитела или по другим причинам.

Антитела по настоящему изобретению включают также антитела с модифицированными (или блокированными) областями Fc для обеспечения измененных эффекторных функций. См., например, Патент США No. 5624821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640-656. Такие модификации можно использовать для усиления или супрессии различных реакций иммунной системы, с возможными благоприятными эффектами для диагностики и терапии. Изменения в области Fc включают изменения аминокислот (замены, делеции и вставки), гликозилирование или дегликозилирование и добавление множественных Fc. Изменения в Fc могут также изменять время полужизни антител в терапевтических антителах, и более длительное время полужизни может приводить к менее частому дозированию, с сопутствующим увеличением удобства и уменьшением использования материала. См. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734-35.

«Полностью человеческое антитело» относится к антителу, содержащему белковые последовательности только человеческого иммуноглобулина. Полностью человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если продуцировано у мыши, в клетке мыши или в гибридоме, происходящей из клетки мыши. Подобным образом, «мышинное антитело» относится к антителу, содержащему последовательности только мышинного иммуноглобулина. Полностью человеческое антитело можно получать у человека, в трансгенном животном, имеющем зародышевые последовательности иммуноглобулина человека, посредством фагового дисплея или других молекулярно-биологических способов.

«Гиперпеременная область» относится к остаткам аминокислот антитела, ответственным за связывание антигена. Гиперпеременная область содержит остатки аминокислот из «определяющей комплементарности области» или «CDR» (например, остатки 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) и 89-97 (CDRL3) в переменной домене легкой

цепи и остатки 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) и 95-102 (CDRH3) в вариабельном домене тяжелой цепи, как определено посредством системы нумерации Kabat (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), и/или такие остатки из «гипервариабельной петли» (т.е. остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи (Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). В рамках изобретения, термин «каркасные» или «FR» остатки относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельной области, определенных в настоящем описании как остатки CDR. Остатки CDR и FR определяют в соответствии со стандартным определением последовательности по Kabat. Kabat *et al.* (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda Md.

«Консервативно модифицированные варианты» или «консервативная замена», относящиеся к заменам аминокислот, известны специалисту в данной области и могут быть осуществлены, в основном, без изменения биологической активности полученной молекулы, даже в необходимых областях полипептида. Такие иллюстративные замены, предпочтительно, осуществляют в соответствии с заменами, указанными в таблице 1, следующим образом:

Таблица 1. Иллюстративные консервативные аминокислотные замены

Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Кроме того, специалисту в данной области известно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в не являющихся необходимыми областях полипептида существенно не изменяют биологическую активность. См., например, Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition).

Фраза «в основном состоит из», или варианты, такие как «в основном состоят из» или «в основном состоящий из», как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывают на включение любых перечисленных элементов или групп элементов, и необязательное включение других элементов, сходной или отличной природы, по отношению к перечисленным элементам, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанных режима дозирования, способа или композиции. В качестве неограничивающего примера, связывающее соединение, которое в основном состоит из перечисленной аминокислотной последовательности, может также включать одну или несколько аминокислот, включая замены одного или нескольких остатков аминокислот, которые существенно не влияют на свойства связывающего соединения.

«Содержащий» или варианты, такие как «содержат», «содержит» или «содержится», используют на протяжении описания и формулы изобретения во включительном смысле, т.е., для указания присутствия указанных признаков, но не для исключения присутствия или добавления дополнительных признаков, которые могут существенно улучшать способ или полезность любого из вариантов осуществления изобретения, если контекст не требует иного посредством явно выраженного или необходимого подразумеваемого утверждения.

«Выделенное антитело» и «выделенный фрагмент антитела» относится к статусу очистки и в таком контексте означает, что указанная молекула является в основном свободной от других биологических молекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы, или другой материал, такой как клеточный дебрис и среда для выращивания. Как правило, термин «выделенный» не предназначен для обозначения полного отсутствия такого материала или отсутствия воды, буферов или солей, если они не присутствуют в количествах, создающих существенные помехи для экспериментального или терапевтического использования связывающего соединения, как описано в настоящем описании.

«Моноклональные антитела» или «mAb», или «Mab», в рамках изобретения, относится к популяции по существу гомогенных антител, т.е., молекулы антител, содержащиеся в популяции, являются идентичными по аминокислотной последовательности, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. В отличие от этого, общепринятые (поликлональные) препараты антител, как правило, включают в себя множество различных антител, обладающих различными аминокислотными последовательностями в их переменных доменах, в частности, в их CDR, которые часто являются специфическими для различных эпитопов. Определение «моноклональное» указывает на характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с настоящим изобретением можно получать способом гибридомы, впервые описанным в Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256: 495, или их можно получать способами рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США No. 4816567). «Моноклональные антитела» можно выделять также

из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных в Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628 и Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, например. См. также Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

«Опухоль», применительно к субъекту, у которого диагностирована злокачественная опухоль, или у которого подозревают наличие злокачественной опухоли, относится к злокачественной или потенциально злокачественной неоплазии или массе ткани любого размера, и включает первичные опухоли и вторичные неоплазии. Солидная опухоль представляет собой аномальный рост или массу ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Различные типы солидных опухолей названы по типу образующих их клеток. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (злокачественные опухоли крови) обычно не формируют солидные опухоли (Национальный институт онкологии США, Словарь онкологических терминов).

Термин «размер опухоли» относится к общему размеру опухоли, который можно измерять как длину и ширину опухоли. Размер опухоли можно определять множеством способов, известных в данной области, например, таких как определение измерений опухоли(опухолей) после удаления у субъекта, например, с использованием штангенциркуля, или во время нахождения в организме, с использованием способов визуализации, например, сканирования костей, ультразвука, сканирования КТ или МРТ.

«Вариабельные области» или «V-область», в рамках изобретения обозначают фрагмент цепей IgG, различающийся по последовательности между различными антителами. Он простирается до остатка по Kabat 109 в легкой цепи и 113 в тяжелой цепи.

Термин «буфер» включает средства, поддерживающие pH раствора составов по изобретению в приемлемом диапазоне, или, для лиофилизированных составов по изобретению, обеспечивающие приемлемый pH раствора перед лиофилизацией.

Термины «лиофилизация», «лиофилизированный» и «сублимированный» относятся к способу, посредством которого материал, подлежащий высушиванию, сначала замораживают, и затем лед или замороженный растворитель удаляют посредством сублимации в условиях вакуума. Наполнитель можно включать в составы до лиофилизации для увеличения стабильности лиофилизированного продукта при хранении.

Термин «фармацевтический состав» относится к препаратам, которые находятся в такой форме, чтобы позволять активным ингредиентам являться эффективными, и которые не содержат дополнительных компонентов, являющихся токсичными для субъектов, которым будут вводить состав. Термин «состав» и «фармацевтический состав» используют взаимозаменяемо на протяжении описания.

«Фармацевтически приемлемый» относится к наполнителям (носителям, добавкам) и композициям, которые можно целесообразно вводить субъекту для обеспечения эффективной дозы используемого активного ингредиента и которые «рассматривают как в основном безопасные» например, которые являются физиологически переносимыми и, как правило, не приводят к аллергической или сходной неблагоприятной реакции, такой как расстройство желудка и т.п., при введении человеку. В другом варианте осуществления,

этот термин относится к молекулам и композициям, одобренным регулирующим органом федерального или регионального правительства, или перечисленным в фармакопее США или другой общепринятой фармакопее для использования у животных, и более конкретно, у человека.

«Разведенный» состав представляет собой состав, полученный посредством разведения лиофилизированного белкового состава в разбавителе, таким образом, что белок распределяется в разведенном составе. Разведенный состав является пригодным для введения, например, парентерального введения), и может, необязательно, являться пригодным для подкожного введения.

«Время разведения» представляет собой время, необходимое для регидратации лиофилизированного состава с использованием раствора до свободного от частиц осветленного раствора.

«Стабильный» состав представляет собой состав, в котором белок в основном сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность при хранении. Различные аналитические способы измерения стабильности белка доступны в данной области, и их обзор приведен в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). Стабильность можно измерять при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Например, в одном варианте осуществления, стабильный состав представляет собой состав без значительных изменений, наблюдаемых при температуре холодильника (2-8°C), в течение по меньшей мере 12 месяцев. В другом варианте осуществления, стабильный состав представляет собой состав без значительных изменений, наблюдаемых при температуре холодильника (2-8°C), в течение по меньшей мере 18 месяцев. В другом варианте осуществления, стабильный состав представляет собой состав без значительных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре (23-27°C) в течение по меньшей мере 3 месяцев. В другом варианте осуществления, стабильный состав представляет собой состав без значительных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре (23-27°C) в течение по меньшей мере 6 месяцев. В другом варианте осуществления, стабильный состав представляет собой состав без значительных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре (23-27°C) в течение по меньшей мере 12 месяцев. В другом варианте осуществления, стабильный состав представляет собой состав без значительных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре (23-27°C) в течение по меньшей мере 18 месяцев. Критерии стабильности состава антитела являются следующими. Как правило, не более 10%, предпочтительно, 5% мономера антитела является деградированным, как измерено посредством SEC-HPLC. Как правило, состав является бесцветным, или от прозрачного до немного опалесцирующего по визуальному анализу. Как правило, концентрация, pH и осмоляльность состава не изменяются более, чем на +/-10%. Активность, как правило, находится в пределах 60-140%, предпочтительно 80-120%, от контроля или эталона. Как правило, наблюдают не более, чем 10%, предпочтительно, 5% укороченных антител, т.е., %

низкомолекулярных молекул, как определено, например, посредством HP-SEC. Как правило, наблюдают не более, чем 10%, предпочтительно, не более, чем 5% агрегации антител, т.е. % высокомолекулярных молекул, как определено, например, посредством HP-SEC.

Антитело «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтическом составе, если для него не показано значительного увеличения агрегации, преципитации и/или денатурации при визуальном обследовании цвета и/или прозрачности, или как измерено посредством УФ светорассеяния, эксклюзионной хроматографии (SEC) и динамического светорассеяния. Изменения конформации белка можно оценивать посредством флуоресцентной спектроскопии, которая определяет третичную структуру белка, и посредством спектроскопии FTIR, которая определяет вторичную структуру белка.

Антитело «сохраняет свою химическую стабильность» в фармацевтическом составе, если для него не показано значительного химического изменения. Химическую стабильность можно оценивать посредством детекции и количественной оценки химически измененных форм белка. Процессы деградации, которые часто изменяют химическую структуру белка, включают гидролиз или укорочение (оцененные такими способами, как эксклюзионная хроматография и SDS-PAGE), окисление (оцененные такими способами, как пептидное картирование в сочетании с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS), дезамидирование (оцененные такими способами, как ионообменная хроматография, капиллярное изoeлектрическое фокусирование, пептидное картирование, измерение содержания изоаспарагиновой кислоты) и изомеризацию (оцененную посредством измерения содержания изоаспарагиновой кислоты, пептидного картирования и т.д.).

Антитело «сохраняет свою биологическую активность» в фармацевтическом составе, если биологическая активность антитела в данное время находится в пределах предопределенного диапазона биологической активности, показанного на время получения фармацевтического состава. Биологическую активность антитела можно определять, например, посредством анализа связывания антигена.

Термин «изотонический» означает, что представляющий интерес состав имеет по существу такое же осмотическое давление, как человеческая кровь. Изотонические составы, как правило, имеют осмотическое давление приблизительно 270-328 мОсм. Немного гипотоническое давление составляет 250-269, и немного гипертоническое давление составляет 328-350 мОсм. Осмотическое давление можно измерять, например, с использованием осмометра парового или определяющего точку заморзания типа.

II. Составы и совместные составы по изобретению.

В одном аспекте, изобретение относится к стабильным биологическим составам, содержащим анти-CTLA4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CTLA4 человека, в качестве активного фармацевтического ингредиента. Включение метионина в такие составы уменьшает окисление остатков метионина, присутствующих в области Fc анти-CTLA4 антитела.

В одном аспекте изобретение относится также к совместному составу анти-CTLA4 антитела с антителом против PD-1. Главные пути деградации пембролизумаба включают окисление метионина 105 (Met105) в CDR3 тяжелой цепи (например, M105 из SEQ ID NO:10) при пероксидном стрессе, и окисление Met105 и остатков метионина Fc при воздействии света. Пембролизумаб сохранял свою биоактивность в большинстве из условий стресса для тестируемых уровней деградации. Однако, уменьшение аффинности к PD-1 наблюдали для подвергнутых пероксидному стрессу образцов посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Экспонированный остаток метионина или остаток метионина в CDR антитела имеет потенциал для влияния на биологическую активность антитела посредством окисления. Добавление метионина может уменьшать окисление Met105 в CDR тяжелой цепи пембролизумаба.

Антитела против PD-1 и их антигенсвязывающие фрагменты

В одном аспекте изобретение относится к стабильным биологическим составам, содержащим анти-CTLA4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в совместном составе с анти-PD-1 антителами человека или их антигенсвязывающими фрагментами, которые специфически связываются с PD-1 человека (например, человеческим или гуманизированным антителом против PD-1), в качестве активного фармацевтического ингредиента (API PD-1), так же как к способам использования составов по изобретению. Любое анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать в совместных составах и способах по изобретению. В конкретных вариантах осуществления, API PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, выбранное из пембролизумаба и ниволумаба. В конкретных вариантах осуществления, анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. В альтернативных вариантах осуществления, анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. В таблице 2 представлены аминокислотные последовательности иллюстративных антител против PD-1 человека пембролизумаба и ниволумаба. Альтернативные антитела против PD-1 и антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в совместных составах и способах по изобретению, показаны в таблице 3.

В рамках изобретения, «пембролизумаб» (ранее известный как MK-3475, SCH 900475 и ламбролизумаб), альтернативно обозначенный в настоящем описании как «пембро», представляет собой гуманизированное mAb IgG4 со структурой, описанной в *WHO Drug Information*, Vol. 27, No. 2, pages 161-162 (2013), и содержащее аминокислотные последовательности и CDR тяжелой и легкой цепи, описанные в таблице 2. Пембролизумаб одобрен U.S. FDA для лечения пациентов с неоперабельной или метастазирующей меланомой и для лечения определенных пациентов с рецидивирующим или метастазирующим плоскоклеточным раком головы и шеи (HNSCC), классической лимфомой Ходжкина (cHL), уротелиальной карциномой, раком желудка, злокачественной опухолью с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и немелкоклеточным раком легкого, как описано в инструкции по использованию препарата КЕЙТРУДА™

(Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ USA; исходно одобренном в США в 2014 г., с обновлением в сентябре 2017 г.).

В некоторых вариантах осуществления, анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в совместных составах по изобретению содержит три CDR легкой цепи из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 и/или три CDR тяжелой цепи из CDRH1, CDRH2 и CDRH3.

В одном варианте осуществления изобретения, CDRL1 представляет собой SEQ ID NO:1 или вариант SEQ ID NO:1, CDRL2 представляет собой SEQ ID NO:2 или вариант SEQ ID NO:2, и CDRL3 представляет собой SEQ ID NO:3 или вариант SEQ ID NO:3.

В одном варианте осуществления, CDRH1 представляет собой SEQ ID NO:6 или вариант SEQ ID NO:6, CDRH2 представляет собой SEQ ID NO:7 или вариант SEQ ID NO:7, и CDRH3 представляет собой SEQ ID NO:8 или вариант SEQ ID NO:8.

В одном варианте осуществления, три CDR легкой цепи представляют собой SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и три CDR тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8.

В альтернативном варианте осуществления изобретения, CDRL1 представляет собой SEQ ID NO:11 или вариант SEQ ID NO:11, CDRL2 представляет собой SEQ ID NO:12 или вариант SEQ ID NO:12, и CDRL3 представляет собой SEQ ID NO:13 или вариант SEQ ID NO:13.

В одном варианте осуществления, CDRH1 представляет собой SEQ ID NO:16 или вариант SEQ ID NO:16, CDRH2 представляет собой SEQ ID NO:17 или вариант SEQ ID NO:17, и CDRH3 представляет собой SEQ ID NO:18 или вариант SEQ ID NO:18.

В одном варианте осуществления, три CDR легкой цепи представляют собой SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, и SEQ ID NO:3, и три CDR тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8.

В альтернативном варианте осуществления, три CDR легкой цепи представляют собой SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, и SEQ ID NO:13, и три CDR тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:18.

В следующем варианте осуществления изобретения, CDRL1 представляет собой SEQ ID NO:21 или вариант SEQ ID NO:21, CDRL2 представляет собой SEQ ID NO:22 или вариант SEQ ID NO:22, и CDRL3 представляет собой SEQ ID NO:23 или вариант SEQ ID NO:23.

В другом варианте осуществления, CDRH1 представляет собой SEQ ID NO:24 или вариант SEQ ID NO:24, CDRH2 представляет собой SEQ ID NO:25 или вариант SEQ ID NO:25, и CDRH3 представляет собой SEQ ID NO:26 или вариант SEQ ID NO:26.

В другом варианте осуществления, три CDR легкой цепи представляют собой SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, и SEQ ID NO:23, и три CDR тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26.

Некоторые антитела против PD-1 человека и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению содержат переменную область легкой цепи и переменную область

тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления, переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:4 или вариант SEQ ID NO:4, и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:9 или вариант SEQ ID NO:9. В следующих вариантах осуществления, переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:14 или вариант SEQ ID NO:14, и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:19 или вариант SEQ ID NO:19. В следующих вариантах осуществления, переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:27 или вариант SEQ ID NO:27 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:28 или вариант SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 или вариант SEQ ID NO:29, или SEQ ID NO:30 или вариант SEQ ID NO:30. В таких вариантах осуществления, вариант последовательности переменной области легкой цепи или тяжелой цепи является идентичным контрольной последовательности, за исключением наличия одной, двух, трех, четырех или пяти аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления, замены находятся в каркасной области (т.е., вне CDR). В некоторых вариантах осуществления, одна, две, три, четыре или пять из аминокислотных замен представляют собой консервативные замены.

В одном варианте осуществления совместных составов по изобретению, анти-PD-1 антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:4 и переменную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:9. В следующем варианте осуществления, анти-PD-1 антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:14, и переменную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:19. В одном варианте осуществления составов по изобретению, анти-PD-1 антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:28, и переменную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:27. В следующем варианте осуществления, анти-PD-1 антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:29 и переменную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:27. В другом варианте осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:30, и переменную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:27.

В другом варианте осуществления, совместные составы по изобретению содержат анти-PD-1 антитело человека или антигенсвязывающий белок, имеющий домен V_L и/или домен V_H с по меньшей мере 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или 50% гомологией последовательности с одним из доменов V_L или доменов V_H , описанных выше, и имеющий специфическое связывание с PD-1. В другом варианте осуществления, анти-PD-1 антитело человека или антигенсвязывающий белок из совместных составов по изобретению содержит домены V_L и V_H , имеющие вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5, или более аминокислотных замен, и имеет специфическое связывание с PD-1.

В любом из вариантов осуществления выше, API PD-1 может представлять собой полноразмерное анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 человека. В конкретных вариантах осуществления, API PD-1 представляет собой полноразмерное анти-PD-1 антитело, выбранное из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE. Предпочтительно, антитело представляет собой антитело IgG. Можно использовать любой изотип IgG, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Различные константные домены можно присоединять к областям V_L и V_H, представленным в настоящем описании. Например, если конкретное намеченное использование антитела (или фрагмента) по настоящему изобретению предусматривает измененные эффекторные функции, можно использовать константный домен тяжелой цепи, отличной от IgG1. Несмотря на то, что антитела IgG1 обеспечивают длительное время полужизни и эффекторные функции, такие как активация комплемента и антителозависимая клеточная цитотоксичность, такие виды активности могут не являться желательными для всех применений антитела. В таких случаях, можно использовать, например, константный домен IgG4.

В вариантах осуществления по изобретению, API PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:5, и тяжелую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:10. В альтернативных вариантах осуществления, API PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:15, и тяжелую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:20. В следующих вариантах осуществления, API PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:32, и тяжелую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:31. В дополнительных вариантах осуществления, API PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:33, и тяжелую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:31. В дополнительных вариантах осуществления, API PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:34, и тяжелую цепь, содержащую или состоящую из последовательности остатков аминокислот, как указано в SEQ ID NO:31. В некоторых совместных составах по изобретению, API PD-1 представляет собой пембролизумаб или биоаналогичный пембролизумаб. В некоторых совместных составах по изобретению, API PD-1 представляет собой ниволумаб или биоаналогичный ниволумаб.

Обычно, варианты аминокислотной последовательности антител против PD-1 и антигенсвязывающих фрагментов по изобретению или анти-CTLA4 антител и

антигенсвязывающих фрагментов по изобретению могут иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью эталонного антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, тяжелой цепью, легкой цепью, V_H , V_L или гуманизированной последовательностью), более предпочтительно, по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, более предпочтительно, по меньшей мере 90%, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 95, 98 или 99%. Идентичность или гомологию, применительно к последовательности, определяют в настоящем описании как процент остатков аминокислот в последовательности-кандидате, которые являются идентичными остаткам антитела против PD-1, после выравнивания последовательностей и внесения пропусков, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, и не рассматривая никаких консервативных замен в качестве части идентичности последовательности. Никакие из N-концевых, C-концевых или внутренних удлинений, делеций или вставок в последовательности антитела не следует рассматривать как влияющие на идентичность или гомологию последовательности.

Идентичность последовательности относится к степени, в которой аминокислоты из двух полипептидов являются одинаковыми в эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены. Идентичность последовательности можно определять с использованием алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями на протяжении полной длины соответствующих эталонных последовательностей. Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, часто используемым для анализа последовательностей: BLAST ALGORITHMS: Altschul, S.F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., *et al.*, «A model of evolutionary change in proteins.» in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., *et al.*, «Matrices for detecting distant relationships.» in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3.» M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; и Altschul, S.F. «Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments.» in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

Подобным образом, любой класс легких цепей можно использовать в композициях и способах в настоящем описании. Конкретно, каппа, лямбда или их варианты можно использовать в настоящих композициях и способах.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности антител против PD-1

Признак антитела	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO.
Легкая цепь пембролизумаба		
CDR1	RASKGVSTSGYSYLH	1
CDR2	LASYLES	2
CDR3	QHSRDLPLT	3
Варибельная область	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKP GQAPRLLIYLA SYLESGVPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVY YCQHSRDLPLTFGGGGTKVEIK	4
Легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKP GQAPRLLIYLA SYLESGVPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVY YCQHSRDLPLTFGGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	5
Тяжелая цепь пембролизумаба		
CDR1	NYMY	6
CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN	7
CDR3	RDYRFDMGFDY	8
Варибельная область	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLT TDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT TVTVSS	9
Тяжелая цепь	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLT TDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT TVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKV DKRVEISKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLK	10
Легкая цепь ниволумаба		
CDR1	RASQSVSSYLA	11
CDR2	DASNRAT	12
CDR3	QQSSNWPRT	13
Варибельная область	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQGGTKVEIK	14
Легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	15
Тяжелая цепь ниволумаба		
CDR1	NSGMH	16

CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKG	17
CDR3	NDDY	18
Вариабельная область	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNS LRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSS	19
Тяжелая цепь	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNS LRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV L DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	20

Таблица 3. Дополнительные антитела против PD-1 и антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в совместных составах, способах и применениях по изобретению.

А. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR легкой и тяжелой цепи hPD-1.08A в WO2008/156712	
CDRL1	SEQ ID NO:21
CDRL2	SEQ ID NO:22
CDRL3	SEQ ID NO:23
CDRH1	SEQ ID NO:24
CDRH2	SEQ ID NO:25
CDRH3	SEQ ID NO:26
С. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельную область тяжелой цепи зрелого h109A и одну из вариабельных областей легкой цепи зрелого K09A в WO 2008/156712	
VR тяжелой цепи	SEQ ID NO:27
VR легкой цепи	SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:29, или SEQ ID NO:30
D. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь зрелого 409 и одну из легких цепей зрелого K09A в WO 2008/156712	
Тяжелая цепь	SEQ ID NO:31
Легкая цепь	SEQ ID NO:32 или SEQ ID NO:33, или SEQ ID NO:34

В некоторых вариантах осуществления совместного состава по изобретению, API PD-1 (т.е. анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) присутствует в концентрации от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В альтернативных вариантах осуществления, API присутствует в концентрации приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл или приблизительно 100 мг/мл.

Анти-CTLA4 антитела их антигенсвязывающие фрагменты

Изобретение относится к стабильным биологическим составам, содержащим анти-CTLA4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически

связываются с CTLA4 человека (например, человеческое или гуманизированное анти-CTLA4 антитело), в качестве активного фармацевтического ингредиента (CTLA4 API), так же как к способам использования составов по изобретению.

Изобретение относится также к стабильным биологическим совместным составам, содержащим (i) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CTLA4 человека (например, человеческое или гуманизированное анти-CTLA4 антитело) и (ii) анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1 человека. Любое анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать в составе, включая совместный состав, и в способах по изобретению. В таблицах 4-8 и на фигуре 34 представлены аминокислотные последовательности иллюстративных анти-CTLA4 антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые можно использовать в составах, включая совместные составы, и в способах по изобретению.

В одном варианте осуществления составов, включая совместный состав, антитело против CTLA-4 представляет собой человеческое моноклональное антитело 10D1, в настоящее время известное как ипилимумаб, и продаваемое на рынке как ервой™, описанное в Патенте США No. 6984720 и *WHO Drug Information* 19(4): 61 (2005). В другом варианте осуществления, антитело против CTLA-4 представляет собой тремелидумаб, также известный как CP-675,206) представляющий собой моноклональное антитело IgG2, описанное в Публикации патентной заявки США No. 2012/263677 или Публикациях Международных заявок PCT No. WO 2012/122444 или 2007/113648 A2.

В одном из составов, включая совместный состав, антитело против CTLA-4 представляет собой моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления, анти-CTLA4 антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент из SEQ ID NO:84 и/или SEQ ID NO:85, где антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CTLA4.

В одном варианте осуществления составов, включая совместный состав, по изобретению антитело против CTLA-4 представляет собой любое из антител против CTLA-4 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в Публикации Международной заявки PCT No. WO 2016/015675 A1. В одном варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее следующие CDR:

HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность GFTFSDNW (SEQ ID NO:35)

HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность IRNKPYN YET (SEQ ID NO:36)

HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность TAQFAY (SEQ ID NO:37)

и/или

LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность ENIYGG (SEQ ID NO:38)

LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность GAT (SEQ ID NO:39)

LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из: QNVLRSPFT (SEQ ID NO:40); QNVLSRHPG (SEQ ID NO:41); ИЛИ QNVLSSRPG (SEQ ID NO:42)

В одном варианте осуществления составов, включая совместный состав, по изобретению, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь. В одном варианте осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепь содержат последовательности VH и VL 8D2/8D2 (RE) или их вариант. В другом варианте осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепь содержат последовательности VH и VL 8D2H1L1 или их вариант. В следующем варианте осуществления, переменная тяжелая цепь и переменная легкая цепь содержат последовательности VH и VL 8D2H2L2 или их вариант. В другом варианте осуществления, переменная тяжелая цепь и переменная легкая цепь содержат последовательности VH и VL 8D3H3L3 или их вариант. В следующем варианте осуществления, переменная тяжелая цепь и переменная легкая цепь содержат последовательности VH и VL 8D2H2L17 или их вариант. В одном варианте осуществления, метионин в положении 18 варианта любого 8D2/8D2 (RE), 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H2L15, или 8D2H2L17 независимо заменен на аминокислоту, выбранную из: лейцина, валина, изолейцина и аланина. В другом варианте осуществления этого варианта, метионин в положении 18 варианта любого 8D2/8D2 (RE), 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H2L15 или 8D2H2L17 заменен на лейцин.

В одном варианте осуществления состава, включая совместный состав, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой 8D2H2L2 или его вариант, где метионин в положении 18 в аминокислотной последовательности переменной тяжелой (VH) цепи варианта 8D2H2L2 независимо заменен на аминокислоту, выбранную из: лейцина, валина, изолейцина и аланина.

ТАБЛИЦА 4: Иллюстративные последовательности анти-CTLA4 антител

Антитело	V _H	V _L
8D2/8D2 (RE)	EVKLDETGGGLVQPGRPMKLS CVASGFTFSDNWMNWVRQSPE KGLEWLAQIRNKPYN YETYY DSVKGRFTISRDDSKSSVYLQM NNLRGEDMGIYYCTAQFAYW GQGTLVTVSA (SEQ ID NO:43)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGTSENI YGGLN WYQRKQ GKSPQLLIFGATNLAD GMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVA TYYCQNVLRSPFTFGSGTKLEI (SEQ ID NO:44)
8D2/8D2 RE, ВАРИАНТ 1	EVKLDETGGGLVQPGRPIKLSC VASGFTFSDNWMNWVRQSPE KGLEWLAQIRNKPYN YETYY DSVKGRFTISRDDSKSSVYLQM	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGTSENI YGGLN WYQRKQ GKSPQLLIFGATNLAD GMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVA

	NNLRGEDMGIYYCTAQFAYW GQGTLVTVSA (SEQ ID NO:86)	TYYCQNVLRSPFTFGSGTKLEI (SEQ ID NO:44)
8D2H1L1	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFSDNWMNWVRQAP GKGLEWLAQIRNKPYNYYETYY SDSVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVYYCTAQFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSENI YGGLNHWYQRKQGKSPKLLIYGATNLAS GMSSRFSGSGSGTDYTLKISSLHPDDVA TYYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:46)
8D2H1L1, ВАРИАНТ 1	EVQLVESGGGLVQPGGSIRLSC AASGFTFSDNWMNWVRQAPG KGLEWLAQIRNKPYNYYETYY DSVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVYYCTAQFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:87)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSENI YGGLNHWYQRKQGKSPKLLIYGATNLAS GMSSRFSGSGSGTDYTLKISSLHPDDVA TYYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:46)
8D2H2L2	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFSDNWMNWVRQAP GKGLEWLAQIRNKPYNYYETYY SASVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVYYCTAQFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:47)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSENI YGGLNHWYQRKPGKSPKLLIYGATNLAS GVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT YYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:48)
8D2H2L2, ВАРИАНТ 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSDNWMNWVRQAPG KGLEWLAQIRNKPYNYYETYY ASVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVYYCTAQFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:88)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSENI YGGLNHWYQRKPGKSPKLLIYGATNLAS GVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT YYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:48)
8D3H3L3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSDNWMNWVRQAPG KGLEWVAQIRNKPYNYYETEYA ASVKGRFTISRDDSKNSAYLQ MNSLKTEDTAVYYCTAQFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENI YGGLNHWYQKPGKAPKLLIYGATSLAS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:50)
8D2H2L15	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFSDNWMNWVRQAP GKGLEWLAQIRNKPYNYYETYY SASVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVYYCTAQFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:51)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSENI YGGLNHWYQRKPGKSPKLLIYGATNLAS GVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT YYCQNVLSRHPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:52)
8D2H2L15, ВАРИАНТ 1	EVQLVESGGGLVQPGGSIRLSC AASGFTFSDNWMNWVRQAPG KGLEWLAQIRNKPYNYYETYY ASVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVYYCTAQFAY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSENI YGGLNHWYQRKPGKSPKLLIYGATNLAS GVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT YYCQNVLSRHPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:52)

	WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:89)	
8D2H2L17	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFSDNWMNWVRQAP GKGLEWLAQIRNKPYNYYEY SASVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVIYYCTAQFAY WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:53)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENI YGGLNWFYQRKPGKSPKLLIYGATNLAS GVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT YYCQNVLSRPFGSGGTKLEIK (SEQ ID NO:54)
8D2H2L17 ВАРИАНТ 1	EVQLVESGGGLVQPGGSIRLSC AASGFTFSDNWMNWVRQAPG KGLEWLAQIRNKPYNYYEYYS ASVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVIYYCTAQFAY WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:90)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENI YGGLNWFYQRKPGKSPKLLIYGATNLAS GVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT YYCQNVLSRPFGSGGTKLEIK (SEQ ID NO:54)
Антитело	Полноразмерная тяжелая цепь	Полноразмерная легкая цепь
8D2H2L2 ВАРИАНТ 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSDNWMNWVRQAPG KGLEWLAQIRNKPYNYYEYYS ASVKGRFTISRDDSKNSVYLQ MNSLKTEDTGVIYYCTAQFAY WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSQVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:99)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENI YGGLNWFYQRKPGKSPKLLIYGATNLAS GVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT YYCQNVLRSPFTFGSGGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:100)

В другом варианте осуществления составов, включая совместный состав, по изобретению, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности цепей VH и VL варианта 1 8D2/8D2 (RE). В следующем варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности цепей VH и VL варианта 1 8D2H1L1. В другом варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности цепей VH и VL варианта 1 8D2H2L2. В следующем варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности цепей VH и VL варианта 8D2H2L15. В другом варианте

осуществления, анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности цепей VH и VL или вариант 8D2H2l17.

В одном варианте осуществления составов, включая совместный состав, по изобретению, анти-CTLA4 антитело представляет собой любое из анти-CTLA4 антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в Международной заявке PCT No. PCT/CN2016/096357, поданной 23 августа 2016 г. В одном варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело представляет собой мышинное антитело 4G10, содержащее следующие аминокислотные последовательности цепи VH и цепи VL, и гуманизированные варианты этого антитела.

ТАБЛИЦА 5: мышинное анти-CTLA4 антитело

Антитело	V _H	V _L
4G10, мышинное	QVKLQESGPVLVKPGASMKISCKAS GYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWI GLINPYNITNYNQKFMGKATFTV DKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCA RLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:55)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGA VTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL GQPKSSPSVTLFQGQFC (SEQ ID NO:56)

В одном варианте осуществления составов, включая совместный состав, по изобретению, анти-CTLA4 антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее следующие CDR:

HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из GYSFTGYT (SEQ ID NO:57) или GYTX₁N (SEQ ID NO:58), где X₁ представляет собой M, V, L, I, G, A, S, T.

HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из INPYNX₁IX₂, (SEQ ID NO:59) где X₁ представляет собой N, D или E, и X₂ представляет собой T, D, E, G или A; или LINPYNX₁IX₂NYX₃QKFX₄G (SEQ ID NO:60), где X₁ представляет собой N, D; X₂ представляет собой T, D, E, G или A; X₃ представляет собой A или N; и X₄ представляет собой Q или M.

HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из LDYRSY (SEQ ID NO:61) или ARLDYRSY (SEQ ID NO:62)

и/или

LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из TGAVTTSNF (SEQ ID NO:63), или GSSTGAVTTSNFX₁N (SEQ ID NO:64), где X₁ представляет собой P или A;

LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из GTNNX₁AX₂ (SEQ ID NO:65), где X₁ представляет собой K, R или любую аминокислоту, кроме M или C; и X₂ представляет собой S или P;

LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из ALX₁YSNHX₂ (SEQ ID NO:66), где X₁ представляет собой W или любую аминокислоту, кроме M или C, и X₂ представляет собой W или любую аминокислоту, кроме M или C; или

ALX₁YSNHX₂V (SEQ ID NO:67), где X₁ представляет собой W или любую аминокислоту, кроме M или C, и X₂ представляет собой W или любую аминокислоту, кроме M или C.

В другом варианте осуществления, гуманизированные последовательности VH из антитела 4G10 содержат любую из следующих последовательностей VH:

ТАБЛИЦА 6: Иллюстративные последовательности анти-CTLA4 антитела

Антитело	V _H
4G10H1, гуманизированное	QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQG LEWIGLINPYNNTNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLTSD SGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:68)
4G10H3, гуманизированное	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQ GLEWIGLINPYNNTNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSD DTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:69)
4G10H4, гуманизированное	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQ GLEWIGLINPYNDITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSD DTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:70)
4G10H5, гуманизированное	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQ GLEWIGLINPYNNDNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSD DTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:71)
4G10H, консенсус, гуманизированный	QVQLVESGAEX ₁ KKPGASX ₂ KX ₃ SCKASGYSFTGYTX ₄ NWVX ₅ QAP GQGLEWIGLINPYNX ₆ IX ₇ NYX ₈ QKFX ₉ GX ₁₀ X ₁₁ TFTVDX ₁₂ SISTAYM ELSRX ₁₃ SDDX ₁₄ GVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:72) X ₁ =V или L X ₂ =V или M X ₃ =V или I X ₄ =M, V, L, I, G, A, S, T X ₅ =R или K X ₆ =N или D, или E X ₇ =T или D, или E, или G, или A X ₈ =A или N X ₉ =Q или M X ₁₀ =R или K X ₁₁ =V или A X ₁₂ =T или K X ₁₃ =R или T X ₁₄ =T или S

В других вариантах осуществления составов, включая совместный состав, по изобретению, гуманизированные последовательности VL из антитела 4G10 содержат любую из следующих последовательностей VL:

ТАБЛИЦА 7: Иллюстративные последовательности анти-CTLA4 антитела

Антитело	V _L
4G10L1, гуманизированное	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFFANWVQEKPGQA FRSLIGGTNNRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCA LWYSNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:73)
4G10L3, гуманизированное	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQA PRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:74)
4G10L, консенсус, гуманизированный	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFX ₁ NWVQ X ₂ KPGQAX ₃ RSLIGGTNNX ₄ AX ₅ WX ₆ PARFSGSLLGGKAALTISGAQP EDEAEYX ₇ CALX ₈ YSNHX ₉ VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:75) X ₁ =P или A X ₂ =Q или E X ₃ =P или F X ₄ =K или R, или любая другая аминокислота, кроме M или C X ₅ =S или P X ₆ =T или V X ₇ =Y или F X ₈ =W или любая аминокислота, кроме M или C X ₉ =W или любая аминокислота, кроме M или C

В некоторых вариантах осуществления, анти-CTLA4 антитело содержит последовательности вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, соответствующие последовательности VH и VL из 4G10H1L1. В другом варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело содержит последовательности вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, соответствующие последовательности VH и VL из 4G10H3L3. В одном варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело содержит последовательности вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, соответствующие последовательности VH и VL из 4G10H3L3. В другом варианте осуществления, анти-CTLA4 антитело содержит последовательности вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, соответствующие последовательности VH и VL из 4G10H5L3.

ТАБЛИЦА 8: Иллюстративные последовательности анти-CTLA4 антитела

Антитело	V _H	V _L
4G10H1L1	QVQLVESGAELVKPGASKMKISC KASGYSFTGYTMNWVKQAPGQ GLEWIGLINPYNNTNYNQKFM GKATFTVDKSISTAYMELSRLTS DDSGVYFCARLDYRSYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:76)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNFFANWVQEKPGQAFRSLIGGTN NRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLT VL (SEQ ID NO:77)
4G10H3L3	QVQLVESGAELVKPGASVKVSC KASGYSFTGYTMNWVRQAPGQ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN

	GLEWIGLINPYNITNYAQKFQ GRVTFTVDTSISTAYMELSRLRS DDTGVIYFCARLDYRSYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:78)	NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCALWYSNHWVFEGGGTKLT VL (SEQ ID NO:79)
4G10H4L3	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSC KASGYSFTGYTMNWVRQAPGQ GLEWIGLINPYNDITNYAQKFQ GRVTFTVDTSISTAYMELSRLRS DDTGVIYFCARLDYRSYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:80)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCALWYSNHWVFEGGGTKLT VL (SEQ ID NO:81)
4G10H5L3	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSC KASGYSFTGYTMNWVRQAPGQ GLEWIGLINPYNIDNYAQKFQ GRVTFTVDTSISTAYMELSRLRS DDTGVIYFCARLDYRSYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:82)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCALWYSNHWVFEGGGTKLT VL (SEQ ID NO:83)

Таблица 9. Дополнительные анти-CTLA4 антитела человека

А. Содержит CDR легкой и тяжелой цепи ипилимумаба

CDRL1	RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO:91)
CDRL2	GAFSRAT (SEQ ID NO:92)
CDRL3	QQYGSSPWT (SEQ ID NO:93)
CDRH1	SYTMH (SEQ ID NO:94)
CDRH2	FISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID NO:95)
CDRH3	TGWLGPFDY (SEQ ID NO:96)

С. Содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи и вариабельную область зрелой легкой цепи ипилимумаба

VR тяжелой цепи	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQA PGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:97)
VR легкой цепи	EIVLTQSPGT LSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:98)

D. Содержит зрелую тяжелую цепь и зрелую легкую цепь ипилимумаба

Тяжелая цепь	SEQ ID NO:84
Легкая цепь	SEQ ID NO:85

В другом варианте осуществления составов, включая совместный состав, по изобретению, антитело против CTLA-4 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, проявляющие перекрестную конкуренцию за связывание с

CTLA-4 человека, или связывающиеся с той же областью эпитопа CTLA-4 человека, что и ипилимумаб, тремелидумаб или любое из вышеописанных антител, включая 8D2/8D2 (RE) или вариант 1 8D2/8D2 (RE), 8D2H1L1 или вариант 1 8D2H1L1, вариант 1 8D2H2L2 или 8D2H2L2, 8D3H3L3, 8D2H2L15 или вариант 1 8D2H2L15, 8D2H2L17 или вариант 1 8D2H2L17, 4G10H1L1 или его вариант, 4G10H3L3 или его вариант, 4G10H3L3 или его вариант, и 4G10H5L3 или его вариант.

Составы

В некоторых аспектах по изобретению, составы, описанные в настоящем описании, минимизируют формирование агрегатов антитела (высокомолекулярных молекул) и частиц, высокомолекулярных и низкомолекулярных молекул, минимизируют окисление остатков метионина, и обеспечивают то, что антитело сохраняет биологическую активность с течением времени.

В одном аспекте изобретение относится к различным составам анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, настоящее изобретение относится к составам, содержащим (i) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, (ii) буфер (например, L-гистидин или ацетат), (iii) невосстанавливающий сахар (например, сахарозу); (iv) неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80); и (v) антиоксидант (например, L-метионин). В одном аспекте состав дополнительно содержит анти-PD-1 антитело. В одном аспекте состав может дополнительно содержать хелатирующий агент. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА).

В одном аспекте изобретение относится также к различным совместным составам анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и антитела против PD-1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к составам, содержащим (i) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, (ii) анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, (iii) буфер (например, L-гистидин или ацетат), (iv) невосстанавливающий сахар (например, сахарозу), (v) неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80) и (vi) антиоксидант (например, L-метионин). В одном варианте осуществления, состав может дополнительно содержать хелатирующий агент (например, ДТРА).

Фармацевтические составы, описанные в настоящем описании, могут включать буферы. Термин «буфер» включает средства, поддерживающие pH раствора жидких составов, описанных в настоящем описании, в приемлемом диапазоне, или, для лиофилизированных составов, описанных в настоящем описании, обеспечивающие приемлемый pH раствора перед лиофилизацией и/или после разведения.

Буферы, которые можно использовать в фармацевтических составах и способах по изобретению, включают сукцинат (натрия или калия), L-гистидин, фосфат (натрия или калия), трис (трис(гидроксиметил)аминометан), диэтаноламин, цитрат (натрия), ацетат (натрия) и т.п. В одном варианте осуществления изобретения, буфер присутствует в составе

в концентрации приблизительно 1-20 мМ (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20 мМ). В конкретных вариантах осуществления изобретения, буфер представляет собой гистидиновый буфер. В другом варианте осуществления, буфер представляет собой L-гистидиновый буфер.

В одном варианте осуществления, буфер имеет рН в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5. В другом варианте осуществления, рН составляет в диапазоне приблизительно 5,0-6,0. В следующем варианте осуществления, диапазон рН составляет приблизительно 5,3-5,8. В другом варианте осуществления, рН составляет приблизительно 5,5. При установлении иллюстративного состава, гистидиновые и ацетатные буферы в диапазоне значений рН 5,0-6,0 исследовали по применимости. Когда указан диапазон значений рН, например, «рН между рН 5,5 и 6,0», диапазон предназначен для включения указанных значений. Например, диапазон от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0 включает 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 и 6,0. Для лиофилизированных составов, если не указано иначе, рН относится к рН после разведения. рН, как правило, измеряют при 25°C с использованием стандартного рН-метра со стеклянным электродом. В рамках изобретения, раствор, содержащий «гистидиновый буфер при рН X», относится к раствору при рН X и содержащему гистидиновый буфер, т.е. рН предназначен для обозначения рН раствора. В некоторых вариантах осуществления совместного состава, в которых совместный состав содержит более высокую концентрацию антитела против PD-1 человека, по сравнению с антителом против CTLA4, рН совместного состава составляет приблизительно 5,0.

В одном варианте осуществления изобретения, состав анти-CTLA4 антитела, и совместный состав анти-CTLA4 антитела и антитела против PD-1 человека содержит невосстанавливающий сахар. В рамках изобретения, «невосстанавливающий сахар» представляет собой сахар, неспособный действовать в качестве восстанавливающего средства, поскольку он не содержит или не может быть переведен в форму, содержащую свободную альдегидную группу или свободную кетонную группу. Примеры невосстанавливающих сахаров включают, но без ограничения дисахариды, такие как сахароза и трегалоза. В одном варианте осуществления, невосстанавливающий сахар присутствует в количестве приблизительно 1-10% (масс./об.) (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10%). В другом варианте осуществления, невосстанавливающий сахар присутствует в количестве от приблизительно 6% до приблизительно 8% (масс./об.) (6, 7 или 8%). В следующем варианте осуществления, невосстанавливающий сахар присутствует в количестве приблизительно 6% (масс./об.). В следующем варианте осуществления, невосстанавливающий сахар присутствует в количестве приблизительно 7% (масс./об.). В следующем варианте осуществления, невосстанавливающий сахар присутствует в количестве приблизительно 8% (масс./об.). В одном варианте осуществления, невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу, трегалозу или рафинозу. В другом варианте осуществления, невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу. В следующем варианте осуществления, сахароза присутствует при 6-8% масс./об.

В одном варианте осуществления, сахара присутствует при 6% (масс./об.). В одном варианте осуществления, сахара присутствует при 7% (масс./об.). В одном варианте осуществления, сахара присутствует при 8% (масс./об.).

Составы, описанные в настоящем описании, содержат также поверхностно-активное вещество. В рамках изобретения, поверхностно-активное вещество представляет собой поверхностно действующее вещество, являющееся амфипатическим по характеру. Поверхностно-активные вещества можно добавлять в составы в настоящем описании для обеспечения стабильности, уменьшения и/или предотвращения агрегации, или для предотвращения и/или ингибирования повреждения белка в условиях переработки, таких как очистка, фильтрация, лиофилизация, транспортировка, хранение и доставка. В одном аспекте изобретения, поверхностно-активное вещество можно использовать для обеспечения дополнительной стабильности активного ингредиента(ингредиентов).

Неионные поверхностно-активные вещества, которые можно использовать в составах и совместных составах, описанных в настоящем описании, включают, но без ограничения, сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана (полисорбаты, продаваемые под торговым наименованием Tween® (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE)) включая полисорбат-20 (полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат), полисорбат-40 (полиоксиэтиленсорбитанмонопальмитат), полисорбат-60 (полиоксиэтиленсорбитанмоностеарат) и полисорбат-80 (полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат); сложные алкиловые эфиры полиоксиэтилена, такие как Brij® 58 (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE) и Brij® 35; полксамеры (например, полксамер 188); Triton® X-100 (Union Carbide Corp., Houston, TX) и Triton® X-114; NP40; Span 20, Span 40, Span 60, Span 65, Span 80 и Span 85; сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, серии неионных поверхностно-активных веществ плуроник®, таких как плуроник® F68, плуроник® 10R5, плуроник® F108, плуроник® F127, плуроник® F38, плуроник® L44, плуроник® L62 (BASF Corp., Ludwigshafen, Germany); и додецилсульфат натрия (SDS). В одном варианте осуществления, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20. В одном варианте осуществления, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. В другом варианте осуществления, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

Количество неионного поверхностно-активного вещества для включения в составы по изобретению представляет собой количество, достаточное для осуществления желательной функции, т.е. минимальное количество, необходимое для стабилизации активного фармацевтического ингредиента (т.е. анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или как анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, так и антитела против PD-1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента) в составе. Все проценты, перечисленные для полисорбата 80, представляют собой % масс./об. Как правило, поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от приблизительно 0,008% до приблизительно 0,1%

масс./об. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, поверхностно-активное вещество присутствует в составе в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1%; от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,09%; от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,08%; от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,07%; от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,06%; от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,05%; от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04%; от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,03%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,02%, от приблизительно 0,015% до приблизительно 0,04%; от приблизительно 0,015% до приблизительно 0,03%, от приблизительно 0,015% до приблизительно 0,02%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,04%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,035% или от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,03%. В конкретных вариантах осуществления, поверхностно-активное вещество присутствует в количестве приблизительно 0,02%. В альтернативных вариантах осуществления, поверхностно-активное вещество присутствует в количестве приблизительно 0,01%, приблизительно 0,015%, приблизительно 0,025%, приблизительно 0,03%, приблизительно 0,035% или приблизительно 0,04%.

В иллюстративных вариантах осуществления изобретения, поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из: полисорбата 20 и полисорбата 80. В предпочтительных вариантах осуществления, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

В конкретных вариантах осуществления, составы, включая совместные составы, по изобретению, содержат от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% масс./об. полисорбата 80. В следующих вариантах осуществления, составы, описанные в настоящем описании, содержат полисорбат 80 в количестве приблизительно 0,008% масс./об., приблизительно 0,01% масс./об. В одном варианте осуществления, количество полисорбата 80 составляет приблизительно 0,015 масс./об.%. В другом варианте осуществления, количество полисорбата 80 составляет приблизительно 0,02% масс./об. В следующем варианте осуществления, количество полисорбата 80 составляет приблизительно 0,025% масс./об. В другом варианте осуществления, количество полисорбата 80 составляет приблизительно 0,03% масс./об. В следующем варианте осуществления, количество полисорбата 80 составляет приблизительно 0,035% масс./об. В другом варианте осуществления, количество полисорбата 80 составляет приблизительно 0,04% масс./об. В следующем варианте осуществления, количество полисорбата 80 составляет приблизительно 0,045% масс./об. В конкретных вариантах осуществления, составы по изобретению содержат приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80.

Составы, включая совместные составы, по настоящему изобретению содержат также метионин или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления, метионин представляет собой L-метионин. В другом варианте осуществления, метионин представляет собой фармацевтически приемлемую соль L-метионина, например, такую как метионин HCl. В одном варианте осуществления, метионин присутствует в составе в

концентрации приблизительно 1-20 мМ (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20 мМ). В другом варианте осуществления, метионин присутствует от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ (5, 6, 7, 8, 9 и 10 мМ). В другом варианте осуществления, метионин присутствует при приблизительно 10 мМ.

Составы и совместные составы, описанные в настоящем описании, могут дополнительно содержать хелатирующий агент. В одном варианте осуществления изобретения, хелатирующий агент присутствует в составе в концентрации приблизительно 1-50 мкМ (например, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкМ). В одном варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ДТРА. В другом варианте осуществления, хелатирующий агент представляет собой ЭДТА. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, ДТРА представляет собой антиоксидант, который может присутствовать в любом из следующих количеств 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкМ в любом из составов, описанных в настоящем описании.

Лиофилизированные композиции

Лиофилизированные составы терапевтических белков обеспечивают несколько преимуществ. Лиофилизированные составы, как правило, обеспечивают лучшую химическую стабильность, чем растворы составов, и таким образом, увеличивают время полужизни. Лиофилизированный состав можно также разводить в различных концентрациях, в зависимости от клинических факторов, таких как способ введения или дозирования. Например, лиофилизированный состав можно разводить в высокой концентрации (т.е. в небольшом объеме), при необходимости, для подкожного введения, или в более низкой концентрации, при внутривенном введении. Высокие концентрации могут также являться необходимыми, если высокие дозы необходимы для конкретного субъекта, в частности при подкожном введении, где объем инъекции необходимо минимизировать. Один из таких лиофилизированных составов антитела описан в Патенте США No. 6267958, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки. Лиофилизированные составы другого терапевтического белка описаны в Патенте США No. 7247707, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Как правило, лиофилизированный состав получают, предусматривая разведение при высокой концентрации продукта лекарственного средства (DP, в одном иллюстративном варианте осуществления, гуманизированного антитела против PD-1 пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента), т.е., предусматривая разведение в низком объеме воды. Последующее разведение водой или изотоническим буфером затем можно легко использовать для разведения DP до более низкой концентрации. Как правило, наполнители включают в лиофилизированный состав по настоящему изобретению на уровнях, которые обеспечивают приблизительно изотонический состав при разведении при высокой концентрации DP, например, для подкожного введения. Разведение в большем объеме воды для получения более низкой концентрации DP неизбежно уменьшает тоничность разведенного раствора, однако, такое уменьшение может не иметь большой важности при

не подкожном, например, внутривенном, введении. Если изотоничность является желательной при более низкой концентрации ДР, лиофилизированный порошок можно разводить в стандартном низком объеме воды, и затем дополнительно разводить изотоническим разбавителем, таким как 0,9% хлорид натрия.

Ллиофилизированные составы по настоящему изобретению получают посредством лиофилизации (сублимации) подготовленного для лиофилизации раствора. Сублимацию осуществляют посредством замораживания состава и последующей сублимации воды при температуре, подходящей для первичной сушки. В этих условиях, температура продукта ниже эвтектической точки или температуры коллапса состава. Как правило, температура стеллажей для первичной сушки лежит в диапазоне приблизительно от -30 до 25°C (при условии, что продукт остается замороженным в ходе первичной сушки) при подходящем давлении, лежащем в диапазоне, как правило, приблизительно от 50 до 250 мторр (от 6,7 до 33,3 Па). Состав, размер и тип контейнера, содержащего образец (например, стеклянного флакона), и объем жидкости определяют время, необходимое для сушки, которое может лежать в диапазоне от нескольких часов до нескольких суток (например, 40-60 час). Стадию вторичной сушки можно проводить при приблизительно 0-40°C, в зависимости, в первую очередь, от типа и размера контейнера, и типа используемого белка. Время вторичной сушки определяется желательным уровнем остаточной влажности в продукте и, как правило, занимает по меньшей мере приблизительно 5 часов. Как правило, содержание влажности в лиофилизированном составе составляет менее, чем приблизительно 5%, и предпочтительно, менее, чем приблизительно 3%. Давление может являться таким же, как давление, используемое на стадии первичной сушки. Условия сублимации можно менять, в зависимости от состава и размера флакона.

В некоторых случаях, может являться желательной лиофилизация белкового состава в контейнере, в котором необходимо проводить разведение белка, чтобы избежать стадии переноса. Контейнер, в этом случае, может, например, представлять собой флакон 3, 5, 10, 20, 50 или 100 см³.

Ллиофилизированные составы по настоящему изобретению разводят перед введением. Белок можно разводить до концентрации приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 или 100 мг/мл, или более высоких концентраций, таких как 150 мг/мл, 200 мг/мл, 250 мг/мл или 300 мг/мл, вплоть до приблизительно 500 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 10-300 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 20-250 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 150-250 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 180-220 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 50-150 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 100 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 75 мг/мл. В одном варианте

осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 50 мг/мл. В одном варианте осуществления, концентрация белка после разведения составляет приблизительно 25 мг/мл. Высокие концентрации белка являются особенно полезными, когда намечена подкожная доставка разведенного состава. Однако, для других способов введения, таких как внутривенное введение, более низкие концентрации белка могут являться желательными (например, приблизительно 5-50 мг/мл).

Разведение, как правило, проводят при температуре приблизительно 25°C для обеспечения полной гидратации, хотя другие температуры можно использовать, как желательно. Время, необходимое для разведения, зависит, например, от типа разбавителя, количества наполнителя(наполнителей) и белка. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), раствор для забуферивания pH (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Жидкие композиции

Жидкий состав антитела можно получать посредством взятия лекарственного вещества (например, гуманизированного антитела против PD-1), которое находится в жидкой форме (например, пембролизумаба в водном составе), и замены его буфера на желательный буфер на последней стадии способа очистки. Стадия лиофилизации не присутствует в этом варианте осуществления. Лекарственное вещество в конечном буфере концентрируют до желательной концентрации. Наполнители, такие как сахароза и полисорбат 80, добавляют к лекарственному веществу и разводят его с использованием подходящего буфера до конечной концентрации белка. Конечный состав лекарственного вещества фильтруют с использованием фильтров 0,22 мкм, и заполняют им конечный контейнер (например, стеклянные флаконы).

III. Способы применения

Изобретение также относится к способу лечения злокачественной опухоли у субъекта, включающему введение эффективного количества любого из составов по изобретению; т.е., любого состава, описанного в настоящем описании, субъекту. В некоторых конкретных вариантах осуществления этого способа, состав вводят субъекту посредством внутривенного введения. В других вариантах осуществления, состав вводят субъекту посредством подкожного введения. В одном варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у пациента-человека, включающему введение любого состава по изобретению пациенту.

В любом из способов по изобретению, злокачественная опухоль может быть выбрана из группы, состоящей из: меланомы, рака легкого, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, множественной миеломы, печеночноклеточного рака, лимфомы, рака почки, мезотелиомы, рака яичника, рака пищевода, рака анального канала, злокачественной опухоли рака желчных протоков, колоректального рака, рака шейки матки, рака щитовидной железы, злокачественной опухоли слюнных желез, рака предстательной

железы (например, невосприимчивой к гормонам аденокарциномы предстательной железы), рака поджелудочной железы, рака ободочной кишки, рака пищевода, рака печени, рака щитовидной железы, глиобластомы, глиомы и других неопластических злокачественных новообразований.

В некоторых вариантах осуществления, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В альтернативных вариантах осуществления, рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления, лимфома представляет собой лимфому Ходжкина.

В других вариантах осуществления, лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому. В конкретных вариантах осуществления, лимфома представляет собой медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

В некоторых вариантах осуществления, рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

В следующих вариантах осуществления, рак молочной железы представляет собой ER+/HER2- рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления, рак мочевого пузыря представляет собой уротелиальную злокачественную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления, рак головы и шеи представляет собой злокачественную опухоль носоглотки. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак щитовидной железы. В других вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль слюнных желез. В других вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения метастазирующего немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) у пациента-человека, включающему введение состава по изобретению пациенту. В конкретных вариантах осуществления, пациент имеет опухоль с высокой экспрессией PD-L1 [(показатель доли опухоли (TPS) $\geq 50\%$)], и его ранее не подвергали лечению с использованием химиотерапии содержащими платину средствами. В других вариантах осуществления, пациент имеет опухоль с экспрессией PD-L1 (TPS $\geq 1\%$), и его ранее подвергали лечению с использованием химиотерапии содержащими платину средствами. В других вариантах осуществления, пациент имеет опухоль с экспрессией PD-L1 (TPS $\geq 1\%$), и его ранее не подвергали лечению с использованием химиотерапии содержащими платину средствами. В конкретных вариантах осуществления, пациент имел прогрессирование заболевания во время или после проведения химиотерапии содержащими платину средствами. В конкретных вариантах осуществления, TPS PD-L1 определяют посредством одобренного FDA тестирования. В конкретных вариантах осуществления, опухоль пациента не имеет геномных аббераций EGFR или ALK. В конкретных вариантах осуществления, опухоль пациента имеет

геномную аберрацию EGFR или ALK, и пациент имел прогрессирование заболевания во время или после проведения лечения аберрации(аберраций) EGFR или ALK, до введения антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой метастазирующий колоректальный рак с высокими уровнями микросателлитной нестабильности (MSI-H).

В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой метастазирующий колоректальный рак с высокими уровнями микросателлитной нестабильности (MSI-H).

В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H).

В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль с высокой нагрузкой мутаций.

В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из: меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рецидивирующей или невосприимчивой классической лимфомы Ходжкина, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, уротелиальной злокачественной опухоли, рака пищевода, рака желудка и печеночноклеточного рака.

В других вариантах осуществления вышеуказанных способов лечения, злокачественная опухоль представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В конкретных вариантах осуществления, гематологическое злокачественное новообразование представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз (CML), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), положительную по EBV DLBCL, первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому, крупноклеточную В-клеточную лимфому с высоким содержанием Т-клеток/гистиоцитов, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина (HL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), множественную миелому (MM), злокачественную опухоль с экспрессией белка-1 лейкоза миелоидных клеток (Mcl-1), миелодиспластический синдром (MDS), неходжкинскую лимфому (NHL) или мелколимфоцитарную лимфому (SLL).

Злокачественные новообразования, для которых показана улучшенная свободная от заболевания и общая выживаемость, применительно к присутствию инфильтрующих опухоль лимфоцитов в биоптате или хирургическом материале, например, при меланоме, колоректальном раке, раке печени, почки, желудка/пищевода, молочной железы, поджелудочной железы и яичника, охвачены способами и видами лечения, описанными в настоящем описании. Известно, что такие подтипы злокачественных опухолей являются чувствительными к иммунному контролю Т-лимфоцитов. Кроме того, охвачены невосприимчивые или рецидивирующие злокачественные новообразования, рост которых можно ингибировать с использованием антител, описанных в настоящем описании.

Дополнительные злокачественные опухоли, при которых можно получать преимущество от лечения с использованием составов, описанных в настоящем описании, включают злокачественные опухоли, ассоциированные с персистирующей инфекцией вирусами, такими как вирусы иммунодефицита человека, вирусы гепатита класса А, В и С, вирус Эпштейна-Барр, вирусы папилломы человека, как известно, имеющие причинно-следственную связь, например, с саркомой Капоши, раком печени, злокачественной опухолью носоглотки, лимфомой, злокачественными опухолями шейки матки, вульвы, анального канала, пениса и полости рта.

Составы можно использовать также для предотвращения или лечения инфекции и инфекционного заболевания. Таким образом, изобретение относится к способу лечения хронической инфекции у субъекта-млекопитающего, включающему введение эффективного количества состава по изобретению субъекту. В некоторых конкретных вариантах осуществления этого способа, состав вводят субъекту посредством внутривенного введения. В других вариантах осуществления, состав вводят субъекту посредством подкожного введения.

Эти средства можно использовать отдельно, или в комбинации с вакцинами, для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и собственные антигены. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для стимуляции иммунного ответа на вирусы, инфекционные для человека, включая, но без ограничения: вирусы иммунодефицита человека, вирусы гепатита класса А, В и С, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус человека, вирусы папилломы человека и вирусы герпеса. Антагонистические антитела против PD-1 или фрагменты антител можно использовать для стимуляции иммунного ответа на инфекцию бактериальных или грибковых паразитов и других патогенов. Вирусные инфекции гепатитом В и С и HIV присутствуют среди инфекций, как считают, являющихся хроническими вирусными инфекциями.

Составы по изобретению можно вводить пациенту в комбинации с одним или несколькими «дополнительными лекарственными средствами». Дополнительное лекарственное средство может представлять собой биологическое лекарственное средство (включая, но без ограничения, антитела против VEGF, EGFR, Her2/neu, рецепторов VEGF, других рецепторов факторов роста, CD20, CD40, CD-40L, OX-40, 4-1BB и ICOS), иммуногенное средство (например, ослабленные злокачественные клетки, антигены опухолей, антигенпредставляющие клетки, такие как дендритные клетки, сенсibilизированные происходящими из опухоли антигеном или нуклеиновыми кислотами, иммуностимулирующие цитокины (например, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины, такие как, но без ограничения, GM-CSF).

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления способов по изобретению, способ дополнительно включает введение дополнительного лекарственного средства. В конкретных вариантах осуществления, дополнительное лекарственное средство представляет собой антитело против LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент,

антитело против GITR или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против CD27 или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления, дополнительное лекарственное средство представляет собой вектор на основе вируса болезни Ньюкасла, экспрессирующий IL-12. В следующем варианте осуществления, дополнительное лекарственное средство представляет собой динациклиб. В дополнительных вариантах осуществления, дополнительное лекарственное средство представляет собой агонист STING.

Пригодные способы введения могут, например, включать парентеральную доставку, включая внутримышечную, подкожную, так же как интратекальную, прямую интравентрикулярную, внутривенную, внутрибрюшинную. Лекарственные средства можно вводить множеством общепринятых способов, таких как внутрибрюшинная, парентеральная, внутриартериальная или внутривенная инъекция. Способы введения, в которых объем раствора должен являться ограниченным (например, подкожное введение) требуют лиофилизированного состава, чтобы позволять разведение в высокой концентрации.

Выбор дозы дополнительного лекарственного средства зависит от нескольких факторов, включая скорость оборота молекулы в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность молекулы, и доступность мишеней - клеток, ткани или органа, у индивидуума, подвергаемого лечению. Доза дополнительного лекарственного средства должна представлять собой количество, обеспечивающее приемлемый уровень побочных эффектов. Соответственно, уровень дозы и частота дозирования каждого дополнительного лекарственного средства (например, биотерапевтического или химиотерапевтического средства) могут зависеть, частично, от конкретного лекарственного средства, тяжести злокачественной опухоли, подвергаемой лечению, и характеристик пациента. Доступны руководства по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и малых молекул. См., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002). Определение соответствующего режима дозирования может осуществлять клиницист, например, с использованием параметров или факторов, как известно или как подозревают в данной области, влияющих на лечение, или как прогнозируют, влияющих на лечение, и определение может зависеть, например, от клинического анамнеза пациента (например, предшествующей терапии), типа и стадии злокачественной опухоли, подлежащей лечению, и биомаркеров ответа на одно или несколько из лекарственных средств при комбинированной терапии.

Доступно множество литературных источников для облегчения выбора фармацевтически приемлемых носителей или наполнителей для дополнительного лекарственного средства. См., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984); Hardman *et al.* (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

Фармацевтический состав антитела можно вводить посредством непрерывной инфузии, или в дозах с интервалами, например, одни сутки, 1-7 раз в неделю, одна неделя, две недели, три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т.д. Предпочтительный способ дозирования представляет собой способ, включающий максимальную дозу или частоту дозирования, исключающую значительные нежелательные побочные эффекты. Общая еженедельная доза, как правило, составляет по меньшей мере 0,05 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 10 мкг/кг, 100 мкг/кг, 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг массы тела или более. См., например, Yang *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji *et al.* (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144. Желательная доза низкомолекулярного лекарственного средства, например, пептидного миметика, природного продукта или органического химического соединения, является приблизительно такой же, как для антитела или полипептида, на основании моль/кг.

Варианты осуществления по изобретению включают также один или несколько из биологических составов, описанных в настоящем описании, (i) для использования в, (ii) для использования в качестве лекарственного средства или композиции для, или (iii) для использования в получении лекарственного средства для: (a) терапии (например, организма человека); (b) медицины; (c) индукции или увеличения противоопухолевого иммунного ответа (d) уменьшения количества одного или нескольких маркеров опухолей у пациента; (e) остановки или замедления роста опухоли или злокачественной опухоли клеток крови; (f) остановки или замедления прогрессирования связанного с CTLA4 или PD-1 заболевания; (g) остановки или замедления прогрессирования злокачественной опухоли; (h) стабилизации связанного с CTLA4 или PD-1 заболевания; (i) ингибирования роста или выживаемости клеток опухолей; (j) уничтожения или уменьшения размера одного или нескольких злокачественных очагов или опухолей; (k) уменьшения прогрессирования, начала или тяжести связанного с CTLA4 или PD-1 заболевания; (l) уменьшения тяжести или длительности клинических симптомов связанного с CTLA4 или PD-1 заболевания, такого как злокачественная опухоль, (m) продления выживаемости пациента относительно ожидаемой выживаемости для сходного не подвергаемого лечению пациента, n) индукции

полной или частичной ремиссии злокачественного состояния или другого связанного с CTLA4 или PD-1 заболевания, о) лечения злокачественной опухоли; или р) лечения хронических инфекций.

ОБЩИЕ СПОСОБЫ

Стандартные способы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning, 3rd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные способы представлены также в Ausbel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology, Vols.1-4*, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, где описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белка (том 3), и биоинформатика (том 4).

Описаны способы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science, Vol. 1*, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение слитых белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science, Vol. 2*, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3*, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16,0,5-16,22,17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны продукция, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology, Vol. 1*, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, выше). Доступны стандартные способы характеристики взаимодействий лиганд/рецептор (см., например, Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology, Vol. 4*, John Wiley, Inc., New York).

Можно получать моноклональные, поликлональные и гуманизированные антитела (см., например, Sheperd and Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenter, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:6205; He, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:1029; Tang *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342:877-883; Foote and Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; Патент США No. 6329511).

Альтернативой гуманизации является использование библиотек человеческих антител, экспонированных на фагах, или библиотек человеческих антител в трансгенных мышцах (Vaughan *et al.* (1996) *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000)

Immunol. Today 21:371-377; Barbas *et al.* (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay *et al.* (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

Очистка антигена не является необходимой для получения антител. Животных можно иммунизировать клетками, несущими представляющий интерес антиген. Затем можно выделять спленоциты от иммунизированных животных, и спленоциты можно сливать с линией клеток миеломы для получения гибридомы (см., например, Meyaard *et al.* (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright *et al.* (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston *et al.*, выше; Kaithamana *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Антитела можно конъюгировать, например, с небольшими молекулами лекарственного средства, ферментами, липосомами, полиэтиленгликолем (PEG). Антитела являются полезными для терапии, диагностики, наборов или других целей, и включают антитела, присоединенные, например, к красителям, радиоактивным изотопам, ферментам или металлам, например, коллоидному золоту (см., например, Le Doussal *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Доступны способы проточной цитометрии, включая активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS) (см., например, Owens, *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Доступны флуоресцентные реагенты, пригодные для модификации нуклеиновых кислот, включая праймеры и зонды на основе нуклеиновой кислоты, полипептиды и антитела, для использования, например, в качестве диагностических реагентов (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Описаны стандартные способы гистологии иммунной системы (см., например, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Доступны пакеты программного обеспечения и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, сворачивания белка, функциональных доменов, участков гликозилирования, и для выравнивания последовательностей (см., например, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Аналитические способы

Аналитические способы, пригодные для оценки стабильности продукта, включают эксклюзионную хроматографию (SEC), тест динамического светорассеяния (DLS), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), количественное определение изо-asp, анализ активности, анализ УФ при 340 нм, УФ-спектроскопию и FTIR. SEC (J. Pharm. Scien., 83:1645-1650, (1994); Pharm. Res., 11:485 (1994); J. Pharm. Bio. Anal., 15:1928 (1997); J. Pharm. Bio. Anal., 14:1133-1140 (1986)) измеряет процент мономера в продукте и дает информацию о количестве растворимых агрегатов. DSC (Pharm. Res., 15:200 (1998); Pharm. Res., 9:109 (1982)) дает информацию о температуре денатурации белка и температуре стеклования. DLS (American Lab., November (1991)) измеряет средний коэффициент диффузии и дает информацию о количестве растворимых и нерастворимых агрегатов. Анализ УФ при 340 нм измеряет интенсивность рассеянного света при 340 нм и дает информацию о приблизительных количествах растворимых и нерастворимых агрегатов. УФ-спектроскопия измеряет оптическую плотность при 278 нм и дает информацию о концентрации белка. FTIR (Eur. J. Pharm. Biopharm., 45:231 (1998); Pharm. Res., 12:1250 (1995); J. Pharm. Scien., 85:1290 (1996); J. Pharm. Scien., 87:1069 (1998)) измеряет ИК-спектр в области амида один, и дает информацию о вторичной структуре белка.

Содержание изо-asp в образцах измеряют с использованием системы детекции изоаспартата Isoquant (Promega). В наборе используют фермент изоаспартил-метилтрансферазу белка (PIMT) для специфической детекции присутствия остатков изоаспарагиновой кислоты в белке-мишени. PIMT катализирует перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина к изоаспарагиновой кислоте в положении альфа-карбоксила, с получением в процессе S-аденозил-L-гомоцистеина (SAH). Это относительно небольшая молекула, и обычно ее можно выделять и количественно оценивать посредством обращеннофазовой HPLC с использованием стандартов SAH для HPLC, предоставленных в наборе.

Активность или биоидентичность антитела можно измерять по его способности связываться со своим антигеном. Специфическое связывание антитела с его антигеном можно количественно оценивать посредством любого способа, известного специалисту в данной области, например, иммуноанализа, такого как ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ).

Содержание всех публикаций, упомянутых в настоящем описании, приведено в качестве ссылки с целью описания и раскрытия способов и материалов, которые можно использовать в сочетании с настоящим изобретением.

При наличии описания различных вариантов осуществления по изобретению в настоящем описании со ссылкой на сопутствующие чертежи, следует понимать, что изобретение не является ограниченным этими точными вариантами осуществления, и что специалист в данной области может осуществлять различные их изменения и модификации без отклонения от объема или содержания изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Стабильность состава анти-CTLA4 антитела в присутствии или в отсутствие метионина

Это исследование проводили для исследования эффекта 10 мМ L-метионина на стабильность состава анти-CTLA4 антитела. Оценивали эффекты следующих видов стресса на составы анти-CTLA4 антител в присутствии и в отсутствие L-метионина:

(1) **Термический стресс** при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ (влажность окружающего воздуха), 25°C (60% относительная влажность), 40°C (75% относительная влажность) - вплоть до 3 месяцев.

(2) **Стресс при встряхивании** в горизонтальном положении (300 об./мин в течение 3 суток)

(3) **Стресс при замораживании-размораживании** (пять циклов замораживания-размораживания от -80°C до $18-22^{\circ}\text{C}$ (размораживание при комнатной температуре в течение 4 часов)).

(4) **Световой стресс** (условия ICH при 0,2x ICH, 0,5x ICH, 1x ICH).

На основании этих данных, состав, содержащий L-метионин, является более стабильным, чем соответствующий состав без L-метионина.

Материалы и способы

Следующие жидкие составы получали с использованием анти-CTLA4 антитела, имеющего следующие CDR: CDRH1 с SEQ ID NO:35, CDRH2 с SEQ ID NO:36, CDRH3 с SEQ ID NO:37, CDRL1 с SEQ ID NO:38, CDRL2 с SEQ ID NO:39 и CDRL3 с SEQ ID NO:40, на остоле IgG1. Последовательности вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи для анти-CTLA4 антитела указаны в SEQ ID NO:88 и 48, соответственно. По 1 мл каждого состава заполняли 2-мл стеклянные флаконы типа-1. Всего заполняли 36 флаконов для состава A1 и 19 флаконов для состава A2. Целевой pH для каждого состава составлял 5,5.

Таблица 10: составы анти-CTLA4 антител

Номер состава	Описание				
A1	Анти-CTLA4 антитело (50 мг/мл)	10 мМ L-гистидинового буфера	7% сахароза (масс./об.)	0,02% PS80 (масс./об.)	10 мМ L-Met
A2	Анти-CTLA4 антитело (50 мг/мл)	10 мМ L-гистидинового буфера	7% сахароза (масс./об.)	0,02% PS80 (масс./об.)	Н/Д

Затем флаконы инкубировали в трех различных условиях хранения: 5°C (влажность окружающего воздуха), 25°C (60% относительная влажность) и 40°C (75% относительная влажность). Данные собирали следующим образом:

Исследования фотостабильности проводили с использованием 1 мл жидких составов A1 и A2 в стеклянных флаконах при комнатной температуре при 0,2X ICH; 0,5X ICH; и 1X ICH.

Концентрации белка измеряли с использованием поглощения УФ при 280 нм.

Образцы уравнивали до комнатной температуры, и исследования мутности (A₃₅₀) проводили для образцов по спектрофотометрическому поглощению при 350 нм.

Проводили оценку образцов по чистоте посредством эксклюзионной хроматографии (SEC), в которой определяли процент мономера, так же как проценты высокомолекулярных молекул (HMW) и пики поздней элюции (LMW молекулы). Сверхвысокоэффективную-эксклюзионную хроматографию (UP-SEC) проводили посредством разведения образцов до 5,0 мг/мл в подвижной фазе (50 мМ фосфате натрия, 450 мМ моногидрохлориде аргинина, pH 7,0). Разведенные образцы инъецировали (6 мкл) в устройство для UPLC, оборудованное колонкой Waters BEH200 и детектором УФ. Белки в образце разделяли по размеру и детектировали по поглощению УФ при 280 нм.

Ионообменную хроматографию проводили для оценки химической стабильности и для мониторинга изменения профиля варианта заряда с течением времени. Способ ионообменной HPLC осуществляли с использованием колонки Dionex ProPac WCX-10 и детектора УФ при 280 нм. Образцы разводили в очищенной воде, и 80 мкг инъецировали для анализа. Подвижная фаза, используемая для анализа ИЕХ термостабильности образцов, представляла собой градиент из следующих подвижных фаз (подвижная фаза А: 20 мМ MOPS, pH 7,2; подвижная фаза В: 50 мМ фосфат натрия, 60 мМ хлорид натрия, pH 8,0). Анализ проводили с использованием градиента подвижной фазы от 20 мМ MOPS, pH 7,2, до 50 мМ фосфата натрия, 60 мМ NaCl, pH 8,0. Детекцию УФ проводят при 280 нм. Эти способы считают эквивалентными, и результаты представляют как относительные проценты на основании общей площади хроматограммы.

Пептидное картирование проводили посредством расщепления Lys-C. Образцы инъецировали в Q Exactive при 30 мкл/образец. Анализ данных проводили посредством программного обеспечения PinPoint.

Результаты исследований указаны в таблицах ниже:

ТАБЛИЦА 11

Условия хранения	5°C			
Составы	Состав А1 (с L-метионином)			
Время (недель)	0	4	8	12
pH	5,7	5,7	5,7	Н.О.
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	54,8	54,1	53,7	Н.О.
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,135	0,135	0,133	Н.О.
UPSEC				
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,07	1,11	1,13	1,16
Низкомолекулярные пики (%)	0,06	0,10	0,07	0,01
Мономер (%)	98,9	98,8	98,8	98,8
HP-IEH				
Кислые варианты (%)	21,79	21,85	23,08	22,88

Условия хранения	5°C			
Составы	Состав А1 (с L-метионином)			
Время (недель)	0	4	8	12
Основные варианты (%)	10,79	9,89	9,94	10,60
Главный (%)	67,4	68,3	67,0	66,5
Пептидное картирование				
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M426	0,8	Н.О.	Н.О.	Н.О.

ТАБЛИЦА 12

Условия хранения	5°C			
Составы	Состав А2, без L-метионина			
Время (недель)	0	4	8	12
pH	5,7	5,7	5,7	NT ¹
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	53,6	54,3	54,0	Н.О.
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,132	0,135	0,132	Н.О.
UPSEC				
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,06	1,13	1,8	Н.О.
Низкомолекулярные пики (%)	0,05	0,06	0,07	Н.О.
Мономер (%)	98,9	98,8	98,8	Н.О.
HP-IEC				
Кислые варианты (%)	21,94	23,20	22,97	Н.О.
Основные варианты (%)	8,67	8,94	11,95	Н.О.
Главный (%)	69,4	67,8	65,1	Н.О.
Пептидное картирование				
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M426	1,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.

Таблица 13:

Условия хранения	25°C			
Составы	Состав 1, с L-метионином			
Время (недель)	0	4	8	12
pH	5,7	5,7	5,7	Н.О.
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	54,8	54,6	53,8	Н.О.
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,135	0,139	0,143	Н.О.

Условия хранения	25°C			
Составы	Состав 1, с L-метионином			
Время (недель)	0	4	8	12
UPSEC				
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,07	1,20	1,24	1,22
Низкомолекулярные пики (%)	0,06	0,14	0,23	0,18
Мономер (%)	98,9	98,7	98,5	98,6
HP-IEH				
Кислые варианты (%)	21,79	23,48	26,53	28,85
Основные варианты (%)	10,79	8,95	11,94	11,79
Главный (%)	67,4	67,6	61,5	59,4
Пептидное картирование				
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M426	0,8	Н.О.	Н.О.	Н.О.

Таблица 14

Условия хранения	25°C			
Составы	Состав A2, без L-метионина			
Время (недель)	0	4	8	12
pH	5,7	5,8	5,8	Н.О.
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	53,6	54,8	54,2	Н.О.
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,132	0,142	0,142	Н.О.
UPSEC				
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,06	1,24	1,33	1,30
Низкомолекулярные пики (%)	0,05	0,14	0,25	0,17
Мономер (%)	98,9	98,6	98,4	98,5
HP-IEH				
Кислые варианты (%)	21,94	25,28	26,91	29,69
Основные варианты (%)	8,67	10,97	11,91	12,01
Главный (%)	69,4	63,8	61,2	58,3
Пептидное картирование				
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M426	1,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.

Таблица 15

Условия хранения	40°C			
Составы	Состав А1, с L-метионином			
Время (недель)	0	4	8	12
рН	5,7	5,7	5,7	Н.О.
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	54,8	54,8	54,2	Н.О.
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,135	0,156	0,183	Н.О.
UPSEC				
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,07	1,22	1,29	1,64
Низкомолекулярные пики (%)	0,06	0,53	0,96	2,32
Мономер (%)	98,9	98,2	97,7	96,0
HP-IEC				
Кислые варианты (%)	21,79	36,96	49,35	61,09
Основные варианты (%)	10,79	11,74	13,82	12,51
Главный (%)	67,4	51,3	36,8	26,4
Пептидное картирование				
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	0,2	Н.О.
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	0,4	Н.О.
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	2,6	Н.О.
% окисления HC-M426	0,8	Н.О.	1,0	Н.О.

Таблица 16

Условия хранения	40°C			
Составы	Состав А2, без L-метионина			
Время (недель)	0	4	8	12
рН	5,7	5,8	5,8	Н.О.
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	53,6	54,9	54,2	Н.О.
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,132	0,168	0,212	Н.О.
UPSEC				
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,06	1,37	1,54	1,62
Низкомолекулярные пики (%)	0,05	0,58	1,04	2,27
Мономер (%)	98,9	98,1	97,5	96,1
HP-IEC				
Кислые варианты (%)	21,94	38,15	51,39	62,84
Основные варианты (%)	8,67	14,43	12,87	12,44
Главный (%)	69,4	47,4	35,7	24,7
Пептидное картирование				

Условия хранения	40°C			
Составы	<u>Состав А2, без L-метионина</u>			
Время (недель)	0	4	8	12
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	0,2	Н.О.
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	0,3	Н.О.
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	5,0	Н.О.
% окисления HC-M426	1,1	Н.О.	2,0	Н.О.

Таблица 17

Состав	<u>Состав А1, с L-метионином</u>						
Стресс	Т0	Замораживание-размораживание	Встряхивание ¹		Фотостабильность (ICH)		
			1 сутки	3 суток	0,2X	0,5X	1X
рН	5,7	5,8	5,8	5,8	5,7	5,7	5,7
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	54,8	54,8	54,3	53,2	54,5	55,2	53,8
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,135	0,133	0,132	0,133	0,181	0,248	0,412
UPSEC							
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,07	1,10	1,08	1,11	1,58	2,13	3,06
Низкомолекулярные пики (%)	0,06	0,06	0,05	0,06	0,16	0,26	0,45
Мономер (%)	98,9	98,8	98,9	98,8	98,3	97,6	96,5
HP-IEC							
Кислые варианты (%)	21,79	22,65	23,08	22,73	26,19	25,89	37,26
Основные варианты (%)	10,79	11,50	10,84	11,15	20,75	20,48	30,92
Главный (%)	67,4	65,9	66,1	66,1	53,1	53,6	31,8
Пептидное картирование							
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,3	0,4	0,8
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,4	0,4	0,4
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.	10,7	18,8	31,6
% окисления HC-M426	0,8	Н.О.	Н.О.	Н.О.	7,2	13,7	25,8

Таблица 18

Состав	Состав А1, с L-метионином						
	Т0	Замораживание-размораживание	Встряхивание ¹		Фотостабильность (ICH)		
			1 сутки	3 суток	0,2X	0,5X	1X
рН	5,7	Н.О.	Н.О.	Н.О.	5,7	5,7	5,6
Концентрация (мг/мл) (A₂₈₀ нм)	53,6	Н.О.	Н.О.	Н.О.	53,9	53,8	54,3
Мутность (A₃₅₀ нм)	0,132	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,187	0,272	0,466
UPSEC							
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,06	Н.О.	Н.О.	Н.О.	1,77	2,48	3,72
Низкомолекулярные пики (%)	0,05	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,16	0,28	0,61
Мономер (%)	98,9	Н.О.	Н.О.	Н.О.	98,1	97,3	95,9
HP-IEC							
Кислые варианты (%)	21,94	Н.О.	Н.О.	Н.О.	27,81	32,36	38,17
Основные варианты (%)	8,67	Н.О.	Н.О.	Н.О.	22,05	29,06	34,19
Главный (%)	69,4	Н.О.	Н.О.	Н.О.	50,1	38,6	27,6
Пептидное картирование							
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,3	0,4	0,7
% окисления HC-M34	0,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,3	0,3	0,4
% окисления HC-M250	2,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.	13,3	24,9	43,2
% окисления HC-M426	1,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.	9,0	18,9	33,7

Результаты

Не присутствовало поддающихся измерению изменений концентрации белка между составами для этих условий и длительности исследования, как измерено по поглощению УФ при 280 нм.

Не присутствовало поддающихся измерению изменений рН между составами для тестируемых условий и длительности исследования.

Данные мутности (A₃₅₀) показаны на **фигуре 1А** и **фигуре 1В**. При 40°C, для обоих составов показана тенденция к увеличению мутности, вплоть до временной точки 8 недель. Для обоих составов, не присутствовало значительных изменений мутности, вплоть до временной точки 8 недель, при 25°C и 5°C. Как показано на **фигуре 2**, для состава А2 показано немного большее (но согласованное) увеличение мутности для всех условий светового стресса, по сравнению с составом А1. Обработка образцов состава А1 с

использованием стрессов либо при замораживании-размораживании (вплоть до 5X), либо при встряхивании (300 об./мин, в течение вплоть до 3 суток) не изменяла мутность образца, по сравнению с контрольными (T0) образцами. Состав A2 не подвергали стрессам при замораживании-размораживании или при встряхивании. Таким образом, состав A1, содержащий L-метионин, является немного более предпочтительным на основании данных мутности.

Как показано на **фигурах 3А, 3В, 4А и 4В**, анализ UP-SEC образцов для определения процента НМВ и процента мономера показал, что при 40°C для обоих составов показана тенденция к увеличению % пика НМВ и % пика LMW (и соответствующему уменьшению % пика мономера), вплоть до временной точки 12 недель. При 25°C, для обоих составов показаны сходные тенденции, но меньшие изменения, по сравнению с 40°C. При 5°C не наблюдали существенных изменений. Как показано на **фигуре 5**, для состава A2 показано немного большее, но согласованное, увеличение %НМВ (и соответствующее немного большее, но согласованное, уменьшение % мономера) для всех исследованных условий светового стресса, по сравнению с составом A1. Обработка образцов состава A1 с использованием стрессов либо при замораживании-размораживании (вплоть до 5X), либо при встряхивании (300 об./мин, в течение вплоть до 3 суток) не изменяла % НМВ или % мономера, по сравнению с контрольными (T0) образцами (см. **фигуру 5 и фигуру 6**). Состав A2 не подвергали стрессам при замораживании-размораживании или при встряхивании. Таким образом, состав A1, содержащий L-метионин, является немного более предпочтительным на основании данных UP-SEC.

Как показано на **фигурах 7А, 7В, 8А, 8В, 9А и 9В**, данные НР-ІЕХ показывают, что при 40°C для обоих составов показана тенденция к увеличению % кислого пика и % основного пика, вплоть до временной точки 12 недель, вместе с соответствующей тенденцией к уменьшению % главного пика. При 25°C, для обоих составов показаны сходные тенденции, но меньшие изменения, по сравнению с 40°C. При 5°C не наблюдали существенных изменений для состава 1 или состава 2, за исключением временной точки 8 недель для состава A2, где наблюдали небольшое увеличение % основного пика и соответствующее небольшое уменьшение % главного пика. Эту тенденцию невозможно было подтвердить во временной точке 12 недель/5°C, поскольку образцы состава A2 не тестировали. Как показано на **фигурах 10-12**, для состава A2 показано немного большее, но согласованное, увеличение % кислого и % основного пиков (и соответствующее немного большее, но согласованное, уменьшение % главного пика) для всех условий светового стресса, вместе с соответствующим уменьшением % главного пика (по сравнению с составом A1). На **фигурах 10-12** показано также, что обработка образцов состава A1 с использованием стрессов либо при замораживании-размораживании (вплоть до 5X), либо при встряхивании (300 об./мин, в течение вплоть до 3 суток), не изменяла % кислого пика, % основного пика или % главного пика, по сравнению с контрольными (T0) образцами (состав 2 не подвергали стрессам при замораживании-размораживании или при

встряхивании). Таким образом, состав A1, содержащий L-метионин, является немного более предпочтительным на основании данных HP-IEH.

Моноклональные антитела часто имеют в области CDR и в области Fc остатки метионина, которые могут быть подвержены окислению при световом стрессе. Для анти-CTLA4 антитела, LC-M4, HC-M34, HC-M250 и HC-M426 могут быть подвержены окислению при световом стрессе. Проводили исследования пептидного картирования для определения изменений уровня окисления этих остатков после воздействия в течение 8 недель обработки с использованием светового стресса при 40°C или 0,2X/0,5X/1X ICH.

Результаты исследований пептидного картирования, показывающие процент окисления в остатках LC-M4, HC-M34, HC-M250 и HC-M426, представлены на **фигуре 13, фигуре 14, фигуре 15 и фигуре 16**, соответственно.

Как показано на **фигурах 13-16**, в условиях светового стресса присутствует увеличение окисления определенных остатков метионина. Примечательно, что для остатков HC-M250 и HC-M426 показано значительное увеличение уровней окисления при обработке с использованием светового стресса при 0,5X и 1X ICH в обоих составах. Однако, присутствие 10 mM L-метионина в составе A1 приводило к меньшему увеличению уровней окисления M250 и M426, по сравнению с составом A2, который не содержал L-метионина. Таким образом, состав 1 (с L-Met) кажется немного более предпочтительным, на основании данных пептидного картирования.

На основании сравнения аналитических данных вышеуказанных исследований, для состава A1, по сравнению с составом A2, показано (i) увеличение мутности для всех условий светового стресса, (ii) меньшее увеличение уровней агрегатов (% HMW) для всех условий светового стресса, (iii) немного меньшее, но согласованное, уменьшение % главного пика для всех условий светового стресса, и (iv) меньшее увеличение уровней окисления остатков HC M250 и HC M426 после светового стресса.

ПРИМЕР 2

Скрининг буфера для состава анти-CTLA4 антитела

В этом исследовании сравнивают стабильность антитела против CTLA4, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:88, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48, в двух различных осуществимых буферах для состава (L-гистидине и ацетате) в присутствии сахарозы, полисорбата 80 и L-метионина. Белок-белковые взаимодействия (показательные для коллоидности и термостабильности) двух составов измеряли (в L-гистидиновом и ацетатном буферах, как показано ниже). Отталкивающее белок-белковое взаимодействие, как показано по положительным значениям параметра диффузионного взаимодействия (K_D) ($K_D > 0$), указывает на стабильный состав с низкой предрасположенностью к агрегации. K_D для обоих составов при трех различных pH (pH 5, 5,5 и 6) измеряли по меньшей мере три раза для каждой (N=3), для получения стандартного отклонения. На основании белок-белковых взаимодействий (данные не представлены или фиг. Y), анти-CTLA4 антитело является стабильным как в L-гистидиновом, так и в ацетатном буфере на протяжении

диапазона pH 5,0-6,0. Таким образом, два состава помещали для дополнительных исследований термостабильности при 5°C, 25°C и 40°C при pH 5,5.

Для оценки стабильности составов, оценивали эффекты следующих стрессов на два состава анти-CTLA4 антитела (в L-гистидиновом буфере и в ацетатном буфере):

(1) **Термический стресс** при 5±3°C (влажность окружающего воздуха), 25°C (60% относительная влажность), 40°C (75% относительная влажность) - вплоть до 3 месяцев.

(2) **Стресс при встряхивании** в горизонтальном положении (300 об./мин в течение 3 суток)

(3) **Стресс при замораживании-размораживании** (пять циклов замораживания-размораживания от -80°C до 18-22°C (размораживание при комнатной температуре в течение 4 часов)).

(4) **Световой стресс** (условия ICH при 0,2x ICH, 0,5x ICH, 1x ICH).

На основании этих данных, анти-CTLA4 антитело является стабильным как в L-гистидиновом буфере, так и в ацетатном буфере.

Материалы и способы

Следующие жидкие составы получали с использованием анти-CTLA4 антитела, имеющего следующие CDR: HCDR1 из SEQ ID NO:35, HCDR2 из SEQ ID NO:36, HCDR3 из SEQ ID NO:37, LCDR1 из SEQ ID NO:38, LCDR2 из SEQ ID NO:39, и LCDR3 из SEQ ID NO:40 на остоле IgG1. По 1 мл каждого состава заполняли 2-мл стеклянные флаконы типа-1. Всего изготавливали по 72 партии для каждого из двух составов. В таблице ниже перечислены композиции двух составов. Сахароза, 7% (масс./об.), добавлена в качестве стабилизатора; PS-80 представляет собой поверхностно-активное вещество, придающее стабильность при индуцированном встряхиванием стрессе; и L-метионин является антиоксидантом, поскольку он уменьшает окисление метионина в условиях светового стресса (см. пример 1 выше).

Таблица 19: Состав

Номер состава	Описание				
B1	Анти-CTLA4 антитело (50 мг/мл)	10 mM L-гистидинового буфера	7% (масс./об.) сахароза	0,02% (масс./об.) полисорбат 80	10 mM L-Met
B2	Анти-CTLA4 антитело (50 мг/мл)	10 mM ацетат	7% (масс./об.) сахароза	0,02% (масс./об.) полисорбат 80	10 mM L-Met

Затем флаконы инкубировали в трех различных условиях хранения: 5°C (влажность окружающего воздуха), 25°C (60% относительная влажность), и 40°C (75% относительная влажность). Данные собирали следующим образом:

Таблица 20: Расписание для состава B1

		2- недел я	4- недел я	6- недел я	8- недел я	Заморо з. оттаи в.	Встряхив. (300 RPM)		свет (ICH)		
	Начал.								X (0.2)	X (0.5)	X (1)
5C	X		X		X	X	X	X			
25C			X		X						
40C		X	X	X	X						

Таблица 21: Расписание для состава B2

		2- недел я	4- недел я	6- недел я	8- недел я	Заморо з. оттаи в.	Встряхив. (300 RPM)		свет (ICH)		
	Начал.								X (0.2)	X (0.5)	X (1)
5C	X		X		X						
25C			X		X						
40C			X	X	X						

Исследования фотостабильности проводили с использованием 1 мл жидких составов B1 и B2 в стеклянных флаконах при комнатной температуре при 0,2X ICH; 0,5X ICH; и 1X ICH.

Концентрации белка измеряли с использованием поглощения УФ при 280 нм.

Образцы уравнивали до комнатной температуры, и исследования мутности (A350) проводили для образцов по спектрофотометрическому поглощению при 350 нм

Проводили оценку образцов по чистоте посредством эксклюзионной хроматографии (SEC), в которой определяли процент мономера, так же как проценты высокомолекулярных молекул (HMW) и пики поздней элюции (LMW молекулы). Сверхвысокоэффективную-эксклюзионную хроматографию (UP-SEC) проводили посредством разведения образцов до 5,0 мг/мл в подвижной фазе (50 mM фосфате натрия, 450 mM моногидрохлориде аргинина, pH 7,0). Разведенные образцы инъецировали (6 мкл) в устройство для UPLC, оборудованное колонкой Waters BEH200 и детектором УФ. Белки в образце разделяли по размеру и детектировали по поглощению УФ при 280 нм.

Ионообменную хроматографию проводили для оценки химической стабильности и для мониторинга изменения профиля варианта заряда с течением времени. Способ ионообменной HPLC осуществляли с использованием колонки Dionex ProPac WCX-10 и

детектора УФ при 280 нм. Образцы разводили в очищенной воде, и 80 мкг инъецировали для анализа. Подвижная фаза, используемая для анализа ИЕХ термостабильности образцов, представляла собой градиент из следующих подвижных фаз (подвижная фаза А: 20 мМ MOPS, pH 7,2; подвижная фаза В: 50 мМ фосфат натрия, 60 мМ хлорид натрия, pH 8,0). Анализ проводили с использованием градиента подвижной фазы от 20 мМ MOPS, pH 7,2, до 50 мМ фосфата натрия, 60 мМ NaCl, pH 8,0. Детекцию УФ проводят при 280 нм. Эти способы считают эквивалентными, и результаты представляют как относительные проценты на основании общей площади хроматограммы.

Пептидное картирование проводили посредством расщепления Lys-C. Образцы инъецировали в Q Exactive при 30 мкл/образец. Анализ данных проводили посредством программного обеспечения PinPoint.

Результаты исследований указаны в таблицах ниже:

Таблица 22

Условия хранения	5°C					
	Состав В1 (L-гистидиновый буфер)			Состав В2 (ацетатный буфер)		
Составы						
Время (недель)	0	4	8	0	4	8
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	48,5	48,9	49,5	49,2	48,9	49,5
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,071	0,069	0,068	0,068	0,071	0,067
HPSEC						
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,17	1,20	1,24	1,15	1,19	1,17
Низкомолекулярные пики (%)	ND	ND	0,01	ND	ND	ND
Мономер (%)	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8
HP-IEC						
Кислые варианты (%)	13,15	13,11	13,25	13,05	13,07	13,12
Основные варианты (%)	12,65	12,75	12,71	12,74	12,81	12,79
Главный (%)	74,2	74,1	74,0	74,2	74,1	74,1
Пептидное картирование						
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	0,1	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M34	0,2	Н.О.	Н.О.	0,2	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M250	1,2	Н.О.	Н.О.	1,3	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M426	0,6	Н.О.	Н.О.	0,6	Н.О.	Н.О.

Таблица 23

Условия хранения	25°C					
	Состав В1 (L-гистидиновый буфер)			Состав В2 (ацетатный буфер)		
Составы						
Время (недель)	0	4	8	0	4	8
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

Условия хранения	25°C					
Составы	Состав В1 (L-гистидиновый буфер)			Состав В2 (ацетатный буфер)		
Время (недель)	0	4	8	0	4	8
Концентрация (мг/мл) (A_{280} нм)	48,5	49,1	49,2	49,2	49,0	49,5
Мутность (A_{350} нм)	0,071	0,071	0,074	0,068	0,069	0,073
HPSEC						
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,17	1,28	1,34	1,15	1,29	1,33
Низкомолекулярные пики (%)	ND	0,06	0,12	ND	0,06	0,11
Мономер (%)	98,8	98,7	98,6	98,8	98,7	98,6
HP-IEC						
Кислые варианты (%)	13,15	15,10	17,50	13,05	15,73	18,77
Основные варианты (%)	12,65	13,39	13,87	12,74	13,41	13,96
Главный (%)	74,2	71,5	68,6	74,2	70,9	67,3
Пептидное картирование						
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	0,1	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M34	0,2	Н.О.	Н.О.	0,2	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M250	1,2	Н.О.	Н.О.	1,3	Н.О.	Н.О.
% окисления HC-M426	0,6	Н.О.	Н.О.	0,6	Н.О.	Н.О.

Таблица 24

Условия хранения	40°C					
Составы	Состав В1 (L-гистидиновый буфер)			Состав В2 (ацетатный буфер)		
Время (недель)	0	4	8	0	4	8
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Концентрация (мг/мл) (A_{280} нм)	48,5	48,7	49,3	49,2	48,8	49,4
Мутность (A_{350} нм)	0,071	0,081	0,101	0,068	0,085	0,094
HPSEC						
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,17	1,34	1,47	1,15	1,42	1,60
Низкомолекулярные пики (%)	ND	0,65	1,47	ND	0,58	1,38
Мономер (%)	98,8	98,0	97,0	98,8	98,0	97,0
HP-IEC						
Кислые варианты (%)	13,15	29,60	44,85	13,05	32,83	49,48
Основные варианты (%)	12,65	15,77	15,55	12,74	15,03	14,74
Главный (%)	74,2	54,6	39,6	74,2	52,1	35,8
Пептидное картирование						
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	0,1	0,1	Н.О.	0,1
% окисления HC-M34	0,2	Н.О.	0,2	0,2	Н.О.	0,2

Условия хранения	40°C					
Составы	Состав В1 (L-гистидиновый буфер)			Состав В2 (ацетатный буфер)		
	0	4	8	0	4	8
% окисления НС-М250	1,2	Н.О.	1,4	1,3	Н.О.	1,7
% окисления НС-М426	0,6	Н.О.	0,7	0,6	Н.О.	0,7

Таблица 25

Составы	Состав В1 (L-гистидиновый буфер)						
Стресс	Т0	Заморажив.- разморажив.	Встряхивание		Фотостабильность (ICH)		
			1 сутки	3 суток	0,2X	0,5X	1X
рН	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,5
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	48,5	49,6	49,0	49,4	49,2	49,2	49,6
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,071	0,069	0,067	0,07	0,081	0,137	0,193
HPSEC							
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,17	1,19	1,20	1,20	1,62	2,00	3,01
Низкомолекулярные пики (%)	ND	ND	ND	0,01	0,02	0,07	0,16
Мономер (%)	98,8	98,8	98,8	98,8	98,4	97,9	96,8
HP-IEC							
Кислые варианты (%)	13,15	13,29	13,19	13,30	15,53	18,36	23,66
Основные варианты (%)	12,65	12,91	12,75	12,89	19,70	25,85	34,22
Главный (%)	74,2	73,8	74,1	73,8	64,8	55,8	42,1
Пептидное картирование							
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,2	0,3	0,6
% окисления НС-М34	0,2	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,3	0,3	0,4
% окисления НС-М250	1,2	Н.О.	Н.О.	Н.О.	6,2	11,5	22,7
% окисления НС-М426	0,6	Н.О.	Н.О.	Н.О.	4,6	8,8	18,8

Таблица 26

Составы	Состав В2 (ацетатный буфер)						
Стресс	Т0	Замор.- размор.	Встряхивание		Фотостабильность (ICH)		
			1 сутки	3 суток	0,2X	0,5X	1X
рН	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Концентрация (мг/мл) (A ₂₈₀ нм)	49,18	49,4	49,1	48,8	49,0	49,1	49,6
Мутность (A ₃₅₀ нм)	0,068	0,066	0,066	0,069	0,075	0,095	0,110

HPSEC							
Высокомолекулярные молекулы (%)	1,15	1,18	1,16	1,16	2,00	3,12	4,69
Низкомолекулярные пики (%)	ND	ND	ND	ND	0,02	0,09	0,17
Мономер (%)	98,8	98,8	98,8	98,8	98,0	96,8	95,1
HP-IEC							
Кислые варианты (%)	13,05	13,17	13,16	13,15	14,30	16,39	18,33
Основные варианты (%)	12,74	13,12	12,89	12,70	22,07	30,87	39,93
Главный (%)	74,2	73,7	74,0	74,1	63,6	52,7	41,7
Пептидное картирование							
% окисления LC-M4	0,1	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,3	0,5	0,8
% окисления HC-M34	0,2	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0,3	0,4	0,5
% окисления HC-M250	1,3	Н.О.	Н.О.	Н.О.	7,9	16,0	29,1
% окисления HC-M426	0,6	Н.О.	Н.О.	Н.О.	6,2	12,5	26,1

Не присутствовало поддающихся измерению изменений концентрации белка между составами для этих условий и длительности исследования, как измерено по поглощению УФ при 280 нм.

Не присутствовало поддающихся измерению изменений pH между составами для тестируемых условий и длительности исследования.

Данные мутности (A350) показаны на **фигуре 17А, фигуре 17В и фигуре 18**. При сравнении данных, обнаружено, что при 40°C, для обоих составов показана тенденция к увеличению мутности вплоть до временной точки 8 недель. При 25°C и 5°C, для обоих составов не показано существенных изменений мутности, вплоть до временной точки 8 недель. Как показано на фигуре 14, наблюдали также, что для состава В1 показано немного большее, но согласованное, увеличение мутности после светового стресса в условиях (0,5X ICH и 1X ICH) по сравнению с составом В2. Обработка образцов с использованием стрессов либо при замораживании-размораживании (вплоть до 5X), либо при встряхивании (300 об./мин, в течение вплоть до 3 суток) не изменяла мутность образца, по сравнению с контрольными (T0) образцами.

Как показано на **фигурах 19А, 19В, 20А и 20В**, анализ UP-SEC образцов для определения процента HMW и процента мономера показал, что при 40°C для обоих составов показана тенденция к увеличению % пика HMW и % пика LMW (и соответствующему уменьшению % пика мономера), вплоть до временной точки 8 недель. При 25°C, для обоих составов показаны сходные тенденции, но меньшие изменения, по сравнению с 40°C. При 5°C не наблюдали существенных изменений. Как показано на **фигурах 21 и 22**, для состава В2 показано немного большее (но согласованное) увеличение %HMW (и соответствующее немного большее, но согласованное, уменьшение % мономера) для всех исследованных условий светового стресса по сравнению с составом В1. Обработка

образцов с использованием стрессов либо при замораживании-размораживании (вплоть до 5X), либо при встряхивании (300 об./мин, в течение вплоть до 3 суток), не изменяла % HMW или % мономера, по сравнению с контрольными (T0) образцами (**фигуры 21 и 22**)

Как показано на **фигурах 23А, 23В, 24А, 24В, 25А и 25В**, данные HP-IEХ показывают, что при 40°C для обоих составов показана тенденция к увеличению % кислого пика и % основного пика, вплоть до временной точки 8 недель, вместе с соответствующей тенденцией к уменьшению % главного пика. Однако, для состава В2 показано немного большее, но согласованное, уменьшение % главного пика по сравнению с составом В1. При 25°C для обоих составов показаны сходные тенденции, но меньшие изменения, по сравнению с 40°C. Как показано на **фигурах 26, 27 и 28**, после светового стресса в условиях (0,5X ICH и 1X ICH), для состава В1 показано немного большее, но согласованное, увеличение % кислых пиков, в то время как для состава В2 показано немного большее (но согласованное) увеличение % основных пиков. Однако, соответствующее уменьшение % главного пика являлось сравнимым для двух составов. Обработка образцов с использованием стрессов либо при замораживании-размораживании (вплоть до 5X), либо при встряхивании (300 об./мин, в течение вплоть до 3 суток), не изменяла % кислого пика, % основного пика, или % главного пика, по сравнению с контрольными (T0) образцами (**Фигуры 26-28**).

Исследования пептидного картирования проводили для определения изменений уровня окисления этих остатков после воздействия в течение 8 недель обработки с использованием светового стресса при 40°C или 0,2X/0,5X/1X ICH.

Результаты исследований пептидного картирования, показывающие процент окисления в остатках LC-M4, HC-M34, HC-M250 и HC-M426, представлены на **фигуре 29, фигуре 30, фигуре 31 и фигуре 32**, соответственно.

Как показано на **фигурах 29-32**, в условиях светового стресса присутствует увеличение окисления определенных остатков метионина. Примечательно, что для остатков HC-M250 и HC-M426 показано значительное увеличение уровней окисления при обработке с использованием светового стресса при 0,5X и 1X ICH в обоих составах. Однако, состав В1 приводил к меньшему увеличению уровней окисления M250 и M426 по сравнению с составом В2.

На основании сравнения аналитических данных вышеуказанных исследований, для состава В1 (с L-гистидиновым буфером), по сравнению с составом В2 (с ацетатным буфером), показано (i) меньшее увеличение уровней агрегатов (% HMW) для всех условий светового стресса, (ii) немного меньшее, но согласованное, уменьшение % главного пика при 40 C, и (iii) меньшее увеличение уровней окисления остатков HC M250 и HC M426 после светового стресса. Таким образом, на основании данных белок-белкового взаимодействия и данных стабильности, показано, что анти-CTLA4 антитело является стабильным как в L-гистидиновом буфере, так и в ацетатом буфере.

ПРИМЕР 3

Совместный состав анти-CTLA4 антитела и антитела против PD-1.

Совместное составление двух антител в один состав является более удобным для пациентов и увеличивает соблюдение режима пациентом. На основании белок-белковых взаимодействий (показанных ниже), обнаружено, что все совместные составы (показанные ниже) являются стабильными на протяжении pH 5,0-6,0. Таким образом, три совместных состава (P1C1, P1C2 и P2C1) при pH 5,5 выбраны и помещены для дополнительных исследований термостабильности при 5°C, 25°C и 40°C, вместе с двумя контрольными составами (анти-PD1 антитела и анти-CTLA4 антитела).

В этом исследовании оценивают стабильность антитела против CTLA4, имеющего следующие CDR: HCDR1 из SEQ ID NO:35, HCDR2 из SEQ ID NO:36, HCDR3 из SEQ ID NO:37, LCDR1 из SEQ ID NO:38, LCDR2 из SEQ ID NO:39 и LCDR3 из SEQ ID NO:40 на остоле IgG1, введенного в совместный состав с пембролизумабом в различных концентрациях, следующим образом:

ТАБЛИЦА 27

<u>Совместные составы</u>	<u>Соотношение пембролизумаб/анти-CTLA4 антитело (масс./масс.)</u>	<u>Пембролизумаб</u>	<u>Анти-CTLA4 антитело</u>	<u>Общая концентрация</u>
P2C1	2:1	25 мг/мл	12,5 мг/мл	37,5 мг/мл
P1C1	1:1	25 мг/мл	25 мг/мл	50 мг/мл
P1C2	1:2	25 мг/мл	50 мг/мл	75 мг/мл
P1C10	1:10	22,72 мг/мл	2,3 мг/мл	25 мг/мл
P10C1	1:10	2,27 мг/мл	22,7 мг/мл	25 мг/мл
P1 (контроль)	1:0	25 мг/мл	Нет	25 мг/мл
C1 (контроль)	0:1	Нет	50 мг/мл	50 мг/мл
25/200	8:1	23,5 мг/мл	2,9 мг/мл	26,4 мг/мл
75/200	8:3	21,1 мг/мл	7,9 мг/мл	29,0 мг/мл

Составы получали в форме жидких составов следующим образом:

Таблица 28

Состав	Буфер	pH	Криопротектор/модификатор тоничности	Поверхностно-активное вещество	Антиоксидант
P2C1	L-гистидин (10 mM)	5, 5,5, 6	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 mM L-Met
P1C1	L-гистидин (10 mM)	5, 5,5, 6	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 mM L-Met
P1C2	L-гистидин (10 mM)	5, 5,5, 6	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 mM L-Met
P1C10	L-гистидин (10 mM)	5, 5,5, 6	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 mM L-Met
P10C1	L-гистидин (10 mM)	5, 5,5, 6	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 mM L-Met

P1 (контроль)	L-гистидин (10 мМ)	5, 5,5, 6	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 мМ L-Met
C1 (контроль)	L-гистидин (10 мМ)	5, 5,5, 6	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 мМ L-Met

По 1 мл каждого состава заполняли флаконы 2R. Стабильность измеряли посредством визуальной проверки, мутности по PD350, концентрации белка, микропроточной визуализации (MFI) (оценки частиц), эксклюзионной хроматографии (SEC) в смешанном режиме (оценки агрегации), cIEF (оценки вариантов заряда), IEX (оценки вариантов заряда) и UP-SEC (оценки агрегации). Поскольку анти-CTLA4 антитело и анти-PD1 антитело совместно элюируются при UP-SEC, в случае совместного состава, анти-PD1 антитело и анти-CTLA4 антитело разделяли посредством SEC в смешанном режиме для оценки стабильности совместного состава. Совместный состав при pH 5,5 использовали в исследованиях термостабильности. Способ исследования термостабильности является следующим:

Таблица 29

	T0	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	Дополнит.
5°C (влажность окружающего воздуха)	3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и	3 комбинации и+ 2 моносостав	9 комбинаций + 9 моносоставов
25°C (60% относит. влажность)		3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и	3 комбинации и+ 2 моносостав	Н/Д
40°C (75% относит. влажность)		3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и+ 2 моносостав	3 комбинации и+ 2 моносостав	Н/Д	Н/Д	Н/Д

Измеряли белок-белковые взаимодействия, показательные для коллоидности и термостабильности, различных совместных составов (3 совместных состава и 2 контрольных). Отталкивающее белок-белковое взаимодействие, как показано по положительному значению параметра диффузионного взаимодействия (K_D) $K_D > 0$ указывает на стабильный состав с низкой предрасположенностью к агрегации. K_d для всех составов при трех различных значениях pH (pH 5,0, 5,5 и 6,0) измеряли по меньшей мере три раза для получения стандартного отклонения. Как показано на **фигуре 33**, комбинации P1C1, P2C2 и P1C2 являются стабильными при каждом из трех значений pH, поскольку все

совместные составы имеют положительные значения K_D . Пембролизумаб (PD1) и богатые пембролизумабом комбинации (P2C1) являются более стабильными при pH 5,0, по сравнению с богатыми CTLA4 комбинациями (P1C2). Богатые CTLA4 комбинации (P1C2) являются в равной степени стабильными при pH 5,0 и pH 5,5. То есть, совместные составы с большей долей пембролизумаба являются более стабильными при pH 5,0, по сравнению с совместными составами с большей долей CTLA4, которые являются в равной степени стабильными при pH 5,0 и 5,5.

Результаты тестирования стабильности в течение 12 месяцев

Через двенадцать месяцев, больших изменений общей концентрации белка (определенной по УФ 280) не наблюдали ни в каких условиях (данные не представлены).

Изменения мутности: Изменения мутности наблюдали вплоть до 12 месяцев в следующем порядке: $5^{\circ}\text{C} < 25^{\circ}\text{C} < 40^{\circ}\text{C}$ для каждого состава. Данные скорости изменения мутности при 40°C в течение вплоть до 6 месяцев, по-видимому, являются прямо пропорциональными общей концентрации белка в каждом составе. (данные не представлены).

Количество частиц (измеренное посредством MFI) во всех составах во всех условиях, по-видимому, является достаточно низким (данные не представлены). Микропроточную визуализацию (MFI) использовали для характеристики образцов совместных составов. Один миллилитр образца отбирали в наконечник пипетки и осторожно прокачивали с помощью насоса (0,17 мл/мин) через проточную ячейку (глубина резкости 150 микрон) микроскопической системы для обеспечения подсчета частиц и получения изображений частиц посредством цифровой камеры. По мере прохождения образцов через проточную ячейку, изображения светлого поля получают в реальном времени в непрерывной последовательности. Выходом в конце анализа являются данные о количестве частиц и концентрации частиц. Изображения MFI можно также обрабатывать с использованием системного программного обеспечения для различных морфологических параметров, таких как размер, интенсивность, прозрачность и форма.

Для каждого из антител против PD-1 и против CTLA4, увеличение % кислых заряженных вариантов, показательных для дезамидирования, для каждого антитела наблюдали при более высоких температурах (25° и 40°C). Способ ионообменной HPLC осуществляли с использованием колонки Dionex ProPac WCX-10 и детектора УФ при 280 нм. Образцы разводили в очищенной воде, и 80 мкг инъецировали для анализа. Подвижная фаза, используемая для анализа IEX термостабильности образцов, представляла собой градиент из следующих подвижных фаз (подвижная фаза А: 24 mM MES pH 6, 4% ацетонитрил; подвижная фаза В: 20 mM NaPO_4 , 95 mM NaCl pH 8, 4% ацетонитрил). Обобщение нормализованных данных cIEF (исходно, через 3 и 6 месяцев) перечислено ниже:

Таблица 30

Образец	aPD1, кислый	aPD1, главный	aPD1, основной	aCTLA, кислый	aCTLA, главный	aCTLA, основной
---------	-----------------	------------------	-------------------	------------------	-------------------	--------------------

P2C1	исходно	20,83	66,99	12,18	19,84	75,13	5,03
P1C1	исходно	20,24	66,38	13,38	19,59	75,26	5,15
P1C2	исходно	18,10	67,84	14,06	18,86	75,77	5,37
P1	исходно	23,70	63,24	13,07			
C1H	исходно				20,12	73,70	6,18
P2C1	3M5C	21,18	65,94	12,88	16,07	78,16	5,77
P1C1	3M5C	20,22	66,79	12,98	24,71	68,71	6,59
P1C2	3M5C	18,51	68,83	12,66	17,06	77,63	5,30
P1	3M5C	24,12	63,15	12,73			
C1H	3M5C				28,13	65,33	6,54
P2C1	3M25C	25,44	62,77	11,79	24,03	69,51	6,46
P1C1	3M25C	24,15	64,99	10,86	24,35	69,31	6,34
P1C2	3M25C	24,63	65,60	9,77	29,18	64,52	6,30
P1	3M25C	28,97	60,41	10,62			
C1H	3M25C				27,23	65,63	7,14
P2C1	3M40C	59,56	36,14	4,30	23,94	39,68	36,38
P1C1	3M40C	59,24	36,22	4,54	62,92	31,53	5,55
P1C2	3M40C	56,68	39,25	4,07	63,29	31,17	5,55
P1	3M40C	43,81	50,20	5,99			
C1H	3M40C				60,31	34,14	5,55
P2C1	6M5C	21,57	35,69	7,08	7,29	25,82	2,55
P1C1	6M5C	15,98	38,73	9,64	10,69	22,35	2,6
P1C2	6M5C	16,62	26,47	7,65	14,02	31,67	3,59
P1	6M5C	36,84	49,21	13,94			
C1H	6M5C				27,56	67,01	5,45
P2C1	6M25C	20,09	29,69	6,34	13,71	27,5	2,67
P1C1	6M25C	28,35	29,98	8,46	13,17	18,09	1,95
P1C2	6M25C	21,9	21,66	5,41	21	26,15	3,87
P1	6M25C	45,43	46,07	8,52			
C1H	6M25C				35,46	57,47	7,05
P2C1	6M40C	56,37	7,93	2,3	27,97	5,44	0
P1C1	6M40C	38,81	16,47	9,93	9,039	10,94	9,37
P1C2	6M40C	28,56	4,33	2,74	55,77	6,7	1,93
P1	6M40C	83,33	12,15	4,53			
C1H	6M40C				89,15	8	2,86

Агрегацию измеряли с использованием UPSEC и SEC в смешанном режиме. Несмотря на то, что анти-CTLA4 антитела и против PD1 совместно элюируются при UP-

SEC, их разделяют и визуализируют посредством SEC в смешанном режиме. Количество агрегатов HMW и агрегатов LMW увеличивалось с увеличением температуры. Результаты UP-SEC показали, что очень низкий процент агрегатов (%HMW) молекул детектировали вплоть до 12 месяцев при 5°C и 25°C, и не присутствовало значительных изменений, по сравнению с исходной временной точкой.

Таблица 31

	HMW, %			LMW, %			Главный, %		
Образец	Исходное значение (T0)			Исходное значение (T0)			Исходное значение (T0)		
C1H	0,93			0			99,07		
P1	0,53			0			99,47		
P1C2	1,12			0			98,88		
P1C1	0,89			0			99,11		
P2C1	0,73			0			99,27		
Образец	1M 5°C	1M 25°C	1M 40°C	1M 5°C	1M 25°C	1M 40°C	1M 5°C	1M 25°C	1M 40°C
C1H	0,93	1,21	0,80	0,00	0,08	0,47	99,1	99,1	98,7
P1	0,48	0,56	0,63	0,00	0,00	0,00	99,5	99,5	99,4
P1C2	0,95	0,99	1,68	0,00	0,00	0,32	98,9	99,1	99,0
P1C1	0,71	0,79	1,33	0,00	0,00	0,24	99,1	99,3	99,2
P2C1	0,65	0,61	1,20	0,00	0,00	0,16	99,3	99,4	99,4
Образец	3M 5°C	3M 25°C	3M 40°C	3M 5°C	3M 25°C	3M 40°C	3M 5°C	3M 25°C	3M 40°C
C1H	0,82	0,84	1,32	0	0,15	1,21	99,18	99,01	97,46
P1	0,56	0,49	0,9	0	0	0,03	99,4	99,51	99,07
P1C2	0,84	1,2	2,04	0	0,16	0,95	99,16	98,64	97,07
P1C1	0,59	0,83	1,53	0	0	0,8	99,41	99,04	97,67
P2C1	0,52	0,52	0,98	0	0,02	0,37	99,48	99,45	98,65
Образец	6M 5°C	6M 25°C	6M 40°C	6M 5°C	6M 25°C	6M 40°C	6M 5°C	6M 25°C	6M 40°C
C1H	0,68	0,71	0,77	0	0,3	1,5	99,32	99	97,74
P1	0,66	0,48	1,13	0	0	0	99,34	99,52	98,87
P1C2	0,66	0,9	1,87	0	0,15	1,29	99,34	98,95	96,83
P1C1	0,62	0,72	1,58	0	0	1	99,38	99,28	97,41
P2C1	0,58	0,62	1,25	0	0	0,67	99,42	99,38	98,08
Образец	9M 5°C	9M 25°C	9M 40°C	9M 5°C	9M 25°C	9M 40°C	9M 5°C	9M 25°C	9M 40°C
C1H	1,31	1,35	ND	0,08	0,77	ND	98,62	97,88	ND
P1	0,7	0,86	ND	0	0,07	ND	99,3	99,07	ND
P1C2	1,28	1,63	ND	0,09	0,54	ND	98,63	97,83	ND
P1C1	1,04	1,3	ND	0,08	0,43	ND	98,88	98,28	ND
P2C1	0,91	1,14	ND	0,08	0,34	ND	99,01	98,52	ND
Образец	12M 5°C	12M 25°C	12M 40°C	12M 5°C	12M 25°C	12M 40°C	12M 5°C	12M 25°C	12M 40°C
C1H	1,34	1,38	ND	0,09	0,94	ND	98,57	97,69	ND

P1	0,68	0,98	ND	0	0,09	ND	99,32	98,92	ND
P1C2	1,31	1,75	ND	0,07	0,72	ND	98,62	97,54	ND
P1C1	1,05	1,39	ND	0,06	0,54	ND	98,9	98,06	ND
P2C1	0,9	1,23	ND	0,06	0,44	ND	99,04	98,34	ND

SEC в смешанном режиме использовали для анализа двух антител в совместном составе по агрегации и окислению молекул. Результаты показаны в таблице ниже. Для пембролизумаба показано увеличение количества окисленных молекул 1 и 2 при высоких температурах, отражающее окисление M105 в одном и двух плечах, соответственно. M105 расположен в CDR3 пембролизумаба. Экспонированный остаток метионина или остаток метионина в CDR антитела имеет потенциал для влияния на биологическую активность антитела посредством окисления. Метионин уменьшает окисление Met105 в CDR тяжелой цепи пембролизумаба. Незначительные изменения окисления молекул, по сравнению с исходными, показывают, что совместный состав является стабильным вплоть до 12 месяцев при 5°C.

Образец	Анти-CTLA4 антитело			Пембролизумаб				
	% HMW	Мономер	%LMW	%HMW	Met105 (2 плеча)	Met105 (1 плечо)	Мономер	%LMW
P2C1, исходно	0,4	98,7	0,9	0,0	6,2	1,3	92,4	0,00
P1C1, исходно	0,4	98,7	0,9	0,0	5,6	1,4	93,0	0,00
P1C2, исходно	0,5	98,6	0,9	0,0	4,3	1,4	94,2	0,00
P1, исходно	Н/Д	Н/Д	Н/Д	0,2	6,4	1,3	92,1	0,00
C1H, исходно	0,6	98,5	1,0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
P2C1, 12M/5C	0,9	99,1	0,0	0,0	8,6	4,6	86,8	0,00
P1C1 12M/5C	0,8	99,2	0,0	0,0	9,0	4,7	86,3	0,00
P1C2, 12M/5C	0,9	99,1	0,0	0,0	9,6	4,8	85,6	0,00
P1, 12M/5C	Н/Д	Н/Д	Н/Д	0,5	8,4	4,5	86,6	0,01
C1H, 12M/5C	0,9	98,5	0,6	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д

На основании данных через двенадцать месяцев, антитела, когда находились в совместном составе, имели хорошее поведение в растворе, подобно составу одного

антитела. Показано, что совместный состав является стабильным при pH 5,0-6,0 с отталкивающим белок-белковым взаимодействием, как измерено по параметру диффузионного взаимодействия белка kD, показателя коллоидности и термостабильности.

Пример 4

Дополнительные совместные составы

В этом исследовании оценивают стабильность антитела против CTLA4, имеющего следующие CDR: HCDR1 из SEQ ID NO:35, HCDR2 из SEQ ID NO:36, HCDR3 из SEQ ID NO:37, LCDR1 из SEQ ID NO:38, LCDR2 из SEQ ID NO:39 и LCDR3 из SEQ ID NO:40, на остоле IgG1, в совместном составе с пембролизумабом в различных концентрациях, следующим образом:

Таблица 32

Совместные составы	Соотношение пембролизумаб/анти-CTLA4 антитело (масс./масс.)	Пембролизумаб	Анти-CTLA4 антитело	Общая концентрация
25/200	8:1	23,5 мг/мл	2,9 мг/мл	26,4 мг/мл
75/200	8:3	21,1 мг/мл	7,9 мг/мл	29,0 мг/мл

Составы получали в форме жидких составов следующим образом:

Таблица 33

Состав	Буфер	pH	Криопротектор/модификатор тоничности	Поверхностно-активное вещество	Антиоксидант
25/200 А	L-гистидин (10 мМ)	5,5	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	0
25/200 В	L-гистидин (10 мМ)	5,5	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	1,6 мМ
25/200 С	L-гистидин (10 мМ)	5,5	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 мМ
75/200 А	L-гистидин (10 мМ)	5,5	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	0
75/200 В	L-гистидин (10 мМ)	5,5	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	1,6 мМ
75/200 С	L-гистидин (10 мМ)	5,5	Сахароза (7%)	PS-80 (0,02%)	10 мМ

Составы помещали на хранение в трех различных условиях: 5°C (влажность окружающего воздуха), 25°C (60% относительная влажность) и 40°C (75% относительная влажность). Составы 75/200 подвергали также воздействию светового стресса (0 ICH, 0,5x ICH, или 1x ICH).

Результаты

Результаты показывают, что увеличивающаяся концентрация метионина уменьшает количество не видимых невооруженным глазом частиц во всех условиях, на основании измерения MFI (данные не представлены). Увеличение концентрации метионина уменьшало % HMW молекул при 40°C, как наблюдали посредством UP-SEC. Увеличение концентрации метионина немного уменьшает мутность при 40°C.

	Состав 75/200 А		Состав 75/200 В		Состав 75/200 С	
	3М, 5С	3М, 40С	3М 5С	3М 40С	3М 5С	3М 40С
Чистота по UPSEC, %						
Высокомолекулярные молекулы(%)	1,10	2,70	1,07	2,41	1,07	2,25
Мономер (%)	98,8	96,7	98,9	97,0	98,9	97,1
Низкомолекулярные молекулы (%)	0,07	0,63	0,07	0,62	0,07	0,62
Варианты заряда по НР-IEХ, %						
Кислые варианты анти-PD1 антитела	20,5	59,1	20,3	58,4	19,9	58,1
Общее количество главного пика анти-PD1 антитела	56,4	29,3	56,6	29,6	56,6	29,6
Основные варианты анти-PD1 антитела	23,1	11,6	23,1	12,0	23,5	12,3
Кислые варианты анти-CTLA4 антитела	14,8	60,5	14,9	59,2	14,9	59,1
Общее количество главного пика анти-CTLA4 антитела	75,5	30,2	75,2	30,8	75,4	31,0
Основные варианты анти-CTLA4 антитела	9,8	9,3	9,9	10,0	9,7	9,9
pH	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4
УФ А350	0,065	0,105	0,067	0,097	0,065	0,090

Пример 5:

Долгосрочная стабильность моносостава CTLA4

Следующий жидкий состав получали с использованием анти-CTLA4 антитела, имеющего следующие CDR: 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 mM L-гистидинового буфера, 7% масс./об. сахарозы, 0,02% масс./об. полисорбата 80, при pH5,5. Продукт распределяли в стеклянные флаконы 2R типа I с эластомерной пробкой и алюминиевым герметизирующим ободком. Объем заполнения составлял 2,0 мл, с избыточным заполнением 0,2 мл. Образцы помещали для исследования стабильности в следующие условия:

- (i) 5°C/влажность окружающего воздуха
- (ii) 25°C/60% относительная влажность
- (iii) 40°C/75% относительная влажность

Образцы тестировали исходно и через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев. Результаты показаны в следующих таблицах:

Таблица 34

5°C/влажность окружающего воздуха						
Измеряемый признак	Временная точка (месяц)					
	Исходно	1	3	6 °	9	12
Биологическая активность по ELISA связывания	95	96	94	106	97	101
Чистота по UPSEC, %						
Высокомолекулярные молекулы(%)	1,11	1,16	1,24	1,31	1,33	1,39
Мономер (%)	98,9	98,8	98,7	98,7	98,6	98,6
Низкомолекулярные молекулы (%)	< QL	< QL	< QL	< QL	< QL	< QL
Варианты заряда по HP-IEC, %						
Кислые варианты	15,42	15,46	15,00	15,71	15,79	15,96
Общее количество главного пика	73,9	73,6	73,3	73,1	73,2	72,7
Основные варианты	10,73	10,95	11,65	11,17	11,02	11,30
Чистота по невосстанавливающему CE-SDS, %	97,6	97,5	97,5	97,6	97,5	97,5
Чистота по восстанавливающему CE-SDS, %	96,7	96,7	96,8	96,0	97,2	96,2
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Концентрация белка	52,3	52,7	53,2	53,3	52,0	52,3
УФ A350	0,081	0,084	0,082	0,096	0,088	0,084
QL=Предел количественного определения (0,10%)						
Образцы для 6 месяцев отбирали на 2 недели раньше, чем по расписанию.						

Таблица 35

25°C/60% относительная влажность						
Измеряемый признак	Временная точка (месяц)					
	Исходно	1	3	6 °	9	12
Биологическая активность по ELISA связывания	95	92	92	95	99	96
Чистота по UPSEC, %						

Высокомолекулярные молекулы(%)	1,11	1,23	1,25	1,34	1,36	1,42
Мономер (%)	98,9	98,7	98,5	98,3	98,0	97,5
Низкомолекулярные молекулы (%)	< QL	< QL	0,30	0,39	0,69	1,05
Варианты заряда по НР-ІЕХ, %						
Кислые варианты	15,42	16,92	20,74	26,70	33,41	38,97
Общее количество главного пика	73,9	71,3	66,5	60,5	53,7	47,8
Основные варианты	10,73	11,81	12,78	12,83	12,87	13,20
Чистота по невосстанавливающему CE-SDS, %	97,6	97,2	96,7	96,2	94,6	94,3
Чистота по восстанавливающему CE-SDS, %	96,7	96,6	96,2	95,5	94,9	94,7
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Концентрация белка	52,3	52,8	53,4	52,8	52,3	51,9
УФ А350	0,081	0,085	0,090	0,096	0,104	0,109
QL=Предел количественного определения (0,10%)						
Образцы для 6 месяцев отбирали на 2 недели раньше, чем по расписанию.						

Таблица 36

40°C/75% относительная влажность						
Измеряемый признак	Временная точка (месяц)					
	Исходно	1	3	6 °	9	12
Биологическая активность по ELISA связывания	95	89	100	91	95	89
Чистота по UPSEC, %						
Высокомолекулярные молекулы(%)	1,11	1,28	1,58	1,98	1,11	1,28
Мономер (%)	98,9	98,1	95,7	93,9	98,9	98,1
Низкомолекулярные молекулы (%)	< QL	0,59	2,75	4,12	< QL	0,59
Варианты заряда по НР-ІЕХ, %						
Кислые варианты	15,42	33,50	60,13	79,20	15,42	33,50
Общее количество главного пика	73,9	52,1	26,8	11,6	73,9	52,1
Основные варианты	10,73	14,38	13,08	9,16	10,73	14,38

Чистота по невосстанавливающему CE-SDS, %	97,6	95,5	91,4	86,1	97,6	95,5
Чистота по восстанавливающему CE-SDS, %	96,7	94,8	91,8	86,3	96,7	94,8
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Концентрация белка	52,3	52,9	53,4	53,0	52,3	52,9
УФ A350	0,081	0,084	0,082	0,096	0,088	0,084
QL=Предел количественного определения (0,10%)						
Образцы для 6 месяцев отбирали на 2 недели раньше, чем по расписанию.						

Результаты:

Как показано по данным выше, не наблюдали значительных изменений, когда состав хранили при 5°C. Ожидали, что такой состав может являться стабильным в течение периода 24 месяца при 5°C. Биологическая активность состава, как определяли по ELISA связывания, показала, что во всех условиях, не наблюдали значительных изменений активности. Не присутствовало изменения pH как функции от времени или условий хранения.

Для концентрации белка в образцах при всех условиях хранения не показано значительного изменения при всех трех условиях, использованных при тестировании стабильности вплоть до 12 месяцев.

Варианты заряда (% кислых вариантов, % главного пика и % основных вариантов) определяли по HP-IEC. В условиях 5°C, не наблюдали значительных изменений в течение 12 месяцев. В условиях 25°C, присутствовало увеличение % кислых вариантов, и уменьшение общего % главного пика, в течение 12 месяцев, при этом % основных вариантов оставался неизменным. Эти результаты не являются неожиданными, с учетом условий хранения. В условиях 40°C, для общего % главного пика показано значимое уменьшение, от исходной временной точки до временной точки 6 месяцев, где % кислых вариантов был значимое увеличен, при этом % основных вариантов оставался неизменным. Эти результаты не являются неожиданными, с учетом условий хранения.

Чистоту определяли по UP-SEC (% HMW молекул, % мономера и % LMW молекул). Не присутствует изменений % мономера или % HMW молекул вплоть до 12 месяцев исследования стабильности при 5° C. Не детектировано пиков LMW молекул в условиях 5°C в течение 12 месяцев. В условиях хранения при 25° C, не присутствует изменений HMW молекул, присутствует небольшое уменьшение % мономера и небольшое увеличение количества LMW молекул в течение 12 месяцев. В условиях 40°C, присутствует небольшое увеличение % HMW молекул вплоть до 6 месяцев, и % мономера был уменьшен ниже 85% во временной точке 6 месяцев. Эти результаты не являются неожиданными, с учетом условий хранения.

Не присутствовало изменения pH как функции от времени или условий хранения.

ПРИМЕР 6

Добавление хелатирующего агента в качестве необязательного наполнителя

Оценивали стабильность составов в присутствии или в отсутствие хелатирующего агента (ДТРА). Для оценки стабильности составов, двумя составами заполняли флаконы и подвергали ступенчатому исследованию стабильности при 5°C (влажность окружающего воздуха), 25°C (60% относительная влажность) и 40°C (75% относительная влажность) - в течение двенадцати недель, с защитой от света. Два состава являлись следующими:

Номер состава	Описание					
1	Анти-CTLA4 антитело (50 мг/мл)	10 mM L-гистидинового буфера (pH=5,5)	7% сахара (масс./об.)	10 mM L-Met	0,02% PS80 (масс./об.)	Н/Д
2	Анти-CTLA4 антитело (50 мг/мл)	10 mM L-гистидинового буфера (pH=5,5)	7% сахара (масс./об.)	10 mM L-Met	0,02% PS80 (масс./об.)	20 мкМ ДТРА

Стабильность образцов, применительно к коллоидности, оценивали по чистоте посредством эксклюзионной хроматографии (SEC), в которой определяли процент мономера, так же как проценты высокомолекулярных молекул (HMW) и пики поздней элюции (LMW молекулы). Данные UPSEC для оценки уровней высокомолекулярных молекул (HMW или агрегатов), % мономера и LMW (низкомолекулярных молекул) представлены в таблице ниже.

Таблица 37

	HMW, %			LMW, %			Главный пик, %		
Состав	Исходное значение (T0)			Исходное значение (T0)			Исходное значение (T0)		
1	0,17			0,01			99,8		
2	0,16			0,03			99,8		
Образец	2Н 5°C	2Н 25°C	2Н 40°C	2Н 5°C	2Н 25°C	2Н 40°C	2Н 5°C	2Н 25°C	2Н 40°C
1	ND	ND	0,30	ND	ND	0,18	ND	ND	99,5
2	ND	ND	0,28	ND	ND	0,17	ND	ND	99,5
Образец	4Н 5°C	4Н 25°C	4Н 40°C	4Н 5°C	4Н 25°C	4Н 40°C	4Н 5°C	4Н 25°C	4Н 40°C
1	0,19	0,29	0,35	0,01	0,06	0,38	99,8	99,7	99,3
2	0,17	0,26	0,33	0,03	0,07	0,35	99,8	99,7	99,8
Образец	8Н 5°C	8Н 25°C	8Н 40°C	8Н 5°C	8Н 25°C	8Н 40°C	8Н 5°C	8Н 25°C	8Н 40°C
1	0,21	0,33	0,44	0,01	0,11	0,76	99,8	99,6	98,8
2	0,19	0,30	0,41	0,02	0,12	0,68	99,8	99,6	98,9
Образец	12Н 5°C	12Н 25°C	12Н 40°C	12Н 5°C	12Н 25°C	12Н 40°C	12Н 5°C	12Н 25°C	12Н 40°C
1	0,28	0,44	0,82	0,5	0,25	2,12	99,7	99,3	97,1
2	0,29	0,42	0,68	0,04	0,23	1,79	99,7	99,3	97,5

Как показано в таблице выше, анализ UP-SEC образцов для определения процента HMW и процента мономера показал, что при 5°C, 25°C и 40°C, для обоих составов показана тенденция к увеличению % пика HMW и % пика LMW (и, следовательно, уменьшению % пика мономера), вплоть до временной точки 12 недель. При 25°C, для обоих составов показаны сходные тенденции, но меньшие изменения, по сравнению с 40°C. При 5°C, не наблюдали существенных изменений. На основании этих данных, для состава 1 (без DTPA) показано небольшое увеличение % HMW и % LMW, по сравнению с составом 2 (с DTPA). Кроме того, для состава 1 показано большее уменьшение % мономера по сравнению с составом 2.

Анализ HP-IEC образцов для определения химической стабильности показал, что при 5°C, 25°C и 40°C, для обоих составов показана тенденция к увеличению % кислого пика и, следовательно, уменьшению % пика мономера, вплоть до временной точки 12 недель. При 25°C, для обоих составов показаны сходные тенденции, но меньшие изменения, по сравнению с 40°C. При 5°C, не наблюдали существенных изменений (данные не представлены).

Результаты в таблице ниже показывают тенденцию к уменьшению концентрации PS80 с течением времени, вплоть до временной точки 8 недель. При 25°C, для обоих составов показаны сходные тенденции, но меньшие изменения, по сравнению с 40°C. При 5°C, не наблюдали существенных изменений. Меньшую деградацию PS80 наблюдали в составе 2 (анти-CTLA4 антитело с DTPA) по сравнению с составом 1 (анти-CTLA4 антитело без DTPA) при 40 °C.

Конц. полисорбата 80 (мг/мл)	состав	T0	4Н	8Н	4Н	8Н	2Н	4Н	8Н
	1	0,19	0,18	0,18	0,17	0,15	0,17	0,16	0,13
	2	0,19	0,18	0,18	0,17	0,15	0,17	0,17	0,16

Таким образом, DTPA может также обеспечивать даже большую стабильность для составов, описанных в настоящем описании.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав, содержащий:

(i) от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(ii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ буфера;

(iii) от приблизительно 6% до приблизительно 8% по массе/объему (масс./об.) невосстанавливающего сахара;

(iv) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% масс./об. неионного поверхностно-активного вещества; и

(v) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ антиоксиданта.

2. Состав по п.1, где анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR легкой цепи, содержащие CDRL1 с SEQ ID NO:38, CDRL2 с SEQ ID NO:39 и CDRL3 с SEQ ID NO:40, и три CDR тяжелой цепи, содержащие CDRH1 с SEQ ID NO:35, CDRH2 с SEQ ID NO:36 и CDRH3 с SEQ ID NO:37.

3. Состав по п.1 или 2, где анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:88, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48.

4. Состав по любому из пп.1-3, pH которого равен от 5,0 до 6,0.

5. Состав по любому из пп.1-4, где буфер представляет собой L-гистидиновый буфер, невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, и антиоксидант представляет собой L-метионин, где состав содержит:

(i) от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(ii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ L-гистидинового буфера;

(iii) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс./об. сахарозы;

(iv) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% масс./об. полисорбата 80; и

(v) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ L-метионина.

6. Состав по п.5, содержащий от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ L-гистидинового буфера.

7. Состав по любому из пп.5-6, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина.

8. Состав по любому из пп.5-7, содержащий полисорбат 80 в массовой доле приблизительно 0,02% масс./об.

9. Состав по любому из пп.1-8, содержащий от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

10. Состав по п.9, где концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 10 мг/мл, 12,5 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 75 мг/мл или 100 мг/мл.

11. Состав по любому из пп.1-5, содержащий приблизительно 25 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

12. Состав по любому из пп.1-5, содержащий приблизительно 50 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

13. Состав по любому из пп.1-5, содержащий приблизительно 75 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

14. Состав по любому из пп.1-5, содержащий приблизительно 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

15. Состав по любому из пп.1-14, pH которого равен приблизительно от 5,3 до приблизительно 5,8.

16. Состав по п.15, pH которого равен приблизительно от 5,5 до приблизительно 5,6.

17. Состав по любому из пп.1-16, дополнительно содержащий анти-PD1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

18. Состав по любому из пп.1-17, дополнительно содержащий хелатирующий агент.

19. Состав по п.18, где хелатирующий агент представляет собой ДТРА.

20. Состав по любому из пп.1-19, содержащийся в стеклянном флаконе или в устройстве для инъекций.

21. Состав по любому из пп.1-20, представляющий собой жидкий состав, который заморожен до по меньшей мере ниже -70°C , или представляет собой раствор, восстановленный из лиофилизированного состава.

22. Состав по любому из пп.1-21, где через 12 месяцев при 5°C :

(i) % мономера анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 95\%$, как определено посредством эксклюзионной хроматографии;

(ii) % тяжелой цепи и легкой цепи анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 90\%$, как измерено посредством восстанавливающего CE-SDS;

(iii) % тяжелой цепи и легкой цепи анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 95\%$, как измерено посредством восстанавливающего CE-SDS;

(iv) % интактного IgG анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 90\%$, как измерено посредством невосстанавливающего CE-SDS; и/или

(v) % интактного IgG анти-CTLA4 антитела составляет $\geq 95\%$, как измерено посредством невосстанавливающего CE-SDS.

23. Состав, содержащий:

(i) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(ii) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

- (iii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ буфера;
- (iv) от приблизительно 6% до приблизительно 8% по массе/объему (масс./об.) невосстанавливающего сахара;
- (v) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% масс./об. неионного поверхностно-активного вещества; и
- (vi) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ антиоксиданта.

24. Состав по п.23, где буфер представляет собой L-гистидиновый буфер, невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, и антиоксидант представляет собой L-метионин, где состав содержит:

- (i) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;
- (ii) от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл анти-PD1 антитела человека, или его антигенсвязывающего фрагмента;
- (iii) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ L-гистидинового буфера;
- (iv) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс./об. сахарозы;
- (v) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% масс./об. полисорбата 80; и
- (vi) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ L-метионина.

25. Состав по п.23 или 24, где анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR легкой цепи, содержащие CDRL1 с SEQ ID NO:38, CDRL2 с SEQ ID NO:39 и CDRL3 с SEQ ID NO:40, и три CDR тяжелой цепи, содержащие CDRH1 с SEQ ID NO:35, CDRH2 с SEQ ID NO:36 и CDRH3 с SEQ ID NO:37.

26. Состав по п.23-25, где анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:88, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48.

27. Состав по любому из пп.23-26, где анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR легкой цепи, содержащие CDRL1 с SEQ ID NO:1, CDRL2 с SEQ ID NO:2 и CDRL3 с SEQ ID NO:3, и три CDR тяжелой цепи, содержащие CDRH1 с SEQ ID NO:6, CDRH2 с SEQ ID NO:7 и CDRH3 с SEQ ID NO:8.

28. Состав по любому из пп.23-27, где анти-PD-1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область V_L , содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, и область V_H , содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9.

29. Состав по любому из пп.23-28, содержащий анти-PD-1 антитело человека, представляющее собой пембролизумаб.

30. Состав по п.23-29, где соотношение анти-PD1 антитела к антителу против CTLA4 составляет 1:2, 1:1, 2:1, 10:1, 1:10, 8:3 или 8:1.

31. Состав по п.30, где соотношение анти-PD1 антитела к антителу против CTLA4 составляет 8:3.

32. Состав по п.30, где соотношение анти-PD1 антитела к антителу против CTLA4 составляет 8:1.

33. Состав по любому из пп.23-32, pH которого равен от 5,0 до 6,0.

34. Состав по любому из пп.23-33, содержащий от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ L-гистидинового буфера.

35. Состав по любому из пп.23-34, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина.

36. Состав по любому из пп.23-35, содержащий полисорбат 80 в массовой доле приблизительно 0,02% масс./об.

37. Состав по любому из пп.23-36, где концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 1,25 мг/мл, 2,5 мг/мл, 2,9 мг/мл, 5 мг/мл, 7,9 мг/мл, 10 мг/мл, 12,5 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 75 мг/мл или 100 мг/мл.

38. Состав по п.37, где концентрация анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 7,9 мг/мл.

39. Состав по любому из пп.23-36, где концентрация анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет приблизительно 25 мг/мл, 22,7 мг/мл, 2,27 мг/мл, 21,1 мг/мл или 23,5 мг/мл.

40. Состав по любому из пп.23-39, где концентрация анти-CTLA4 антитела составляет приблизительно 7,9 мг/мл, и концентрация анти-PD1 антитела составляет приблизительно 21 мг/мл.

41. Состав по любому из пп.23-39, содержащий приблизительно 25 мг/мл анти-PD1 антитела и приблизительно 12,5 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

42. Состав по любому из пп.23-39, содержащий приблизительно 25 мг/мл анти-PD1 антитела и приблизительно 25 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

43. Состав по любому из пп.23-39, содержащий приблизительно 25 мг/мл анти-PD1 антитела и приблизительно 50 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

44. Состав по любому из пп.23-39, содержащий приблизительно 22,72 мг/мл анти-PD1 антитела и приблизительно 2,3 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

45. Состав по любому из пп.23-39, содержащий приблизительно 2,27 мг/мл анти-PD1 антитела и приблизительно 22,7 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

46. Состав по любому из пп.23-39, содержащий приблизительно 23,5 мг/мл анти-PD1 антитела и приблизительно 2,9 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

47. Состав по любому из пп.23-39, содержащий приблизительно 21,1 мг/мл анти-PD1 антитела и приблизительно 7,9 мг/мл анти-CTLA4 антитела, 10 мМ L-гистидинового буфера, приблизительно 7% масс./об. сахарозы, приблизительно 0,02% масс./об. полисорбата 80 и приблизительно 10 мМ L-метионина.

48. Состав по любому из пп.23-47, дополнительно содержащий хелатирующий агент.

49. Состав по п.23-48, где хелатирующий агент представляет собой ДТРА.

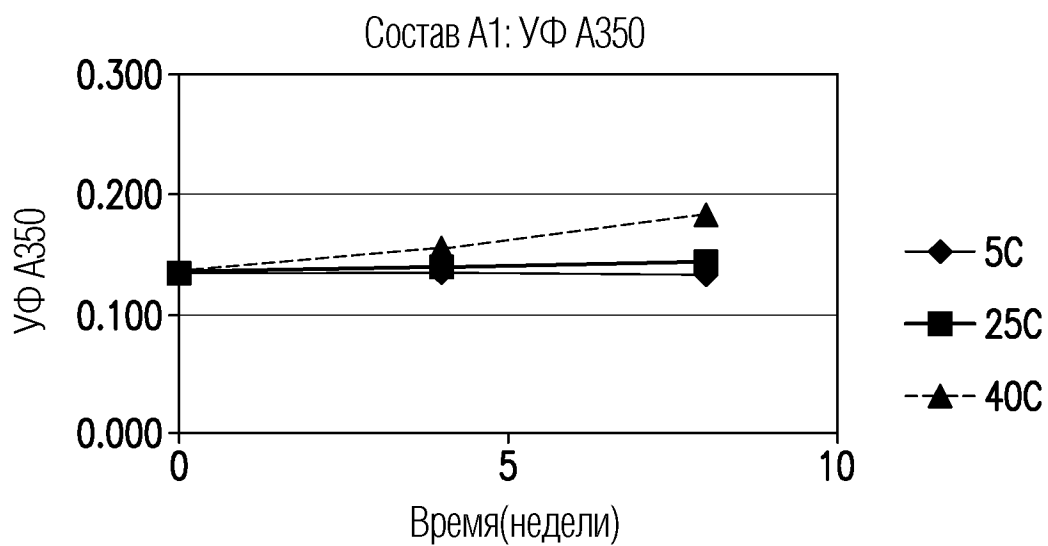
50. Состав по любому из пп.23-49, где состав содержится в стеклянном флаконе или в устройстве для инъекций.

51. Состав по любому из пп.23-50, представляющий собой жидкий состав, или состав заморожен до по меньшей мере ниже -70°C или восстановлен из лиофилизированного состава.

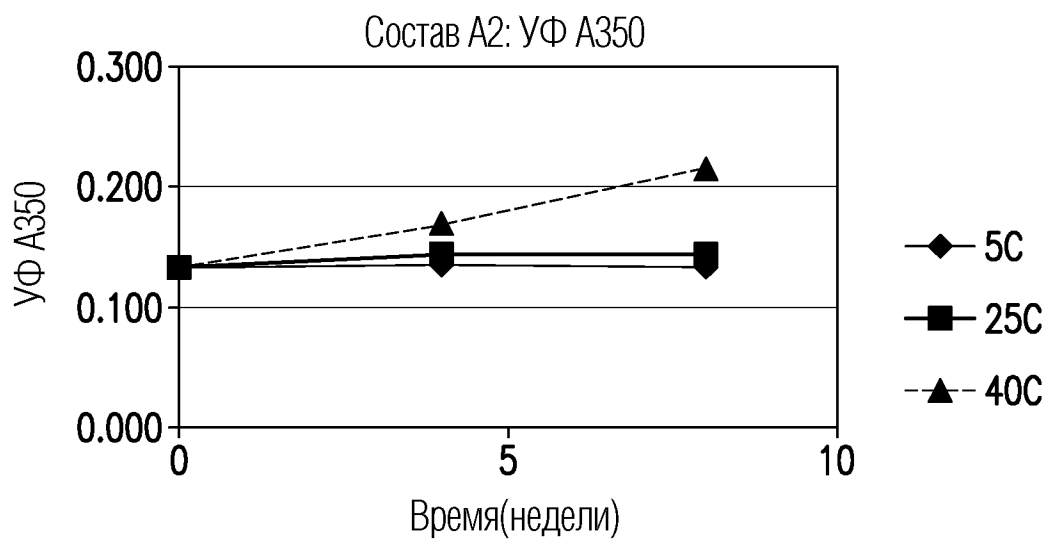
52. Способ лечения злокачественной опухоли или хронической инфекции у нуждающегося в этом пациента-человека, включающий введение эффективного количества состава по любому из пп.1-51.

53. Применение состава по любому из пп.1-51 для получения лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли или для лечения хронической инфекции.

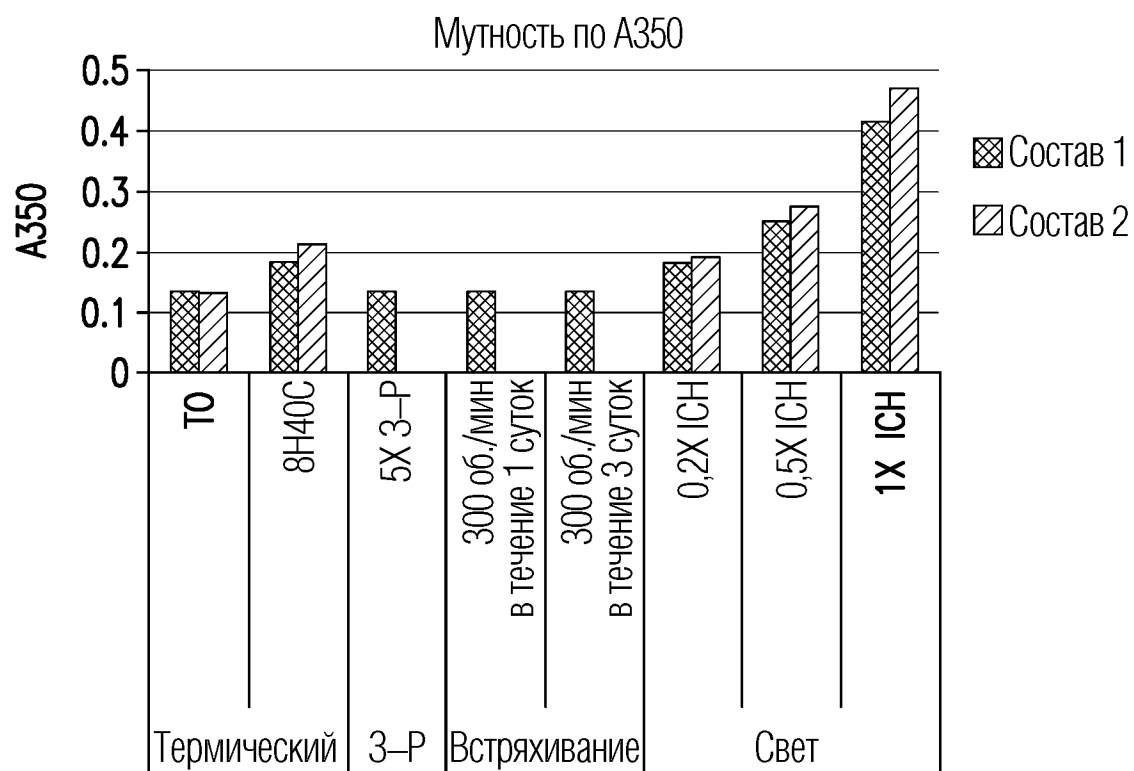
По доверенности



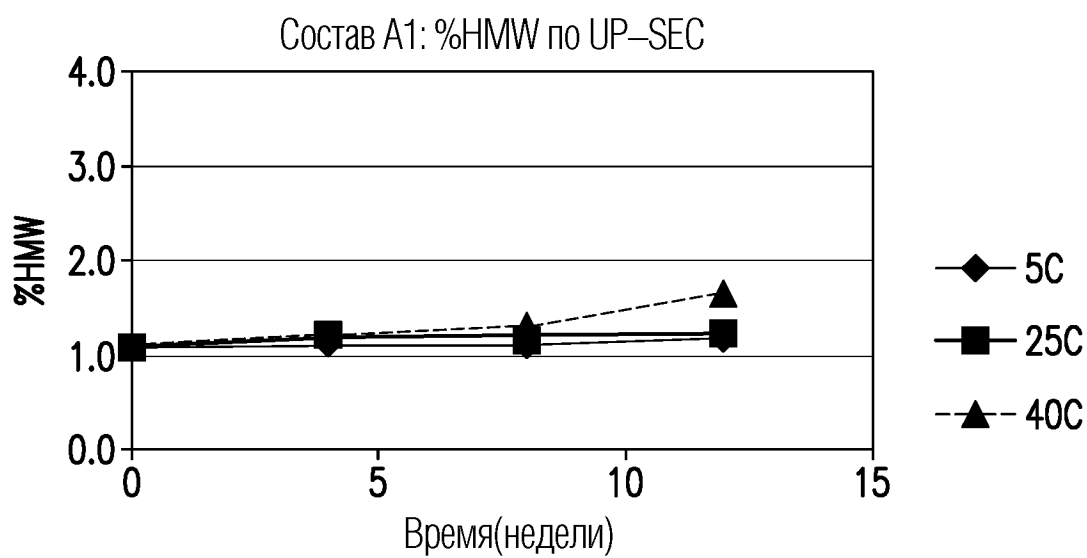
ФИГ. 1А



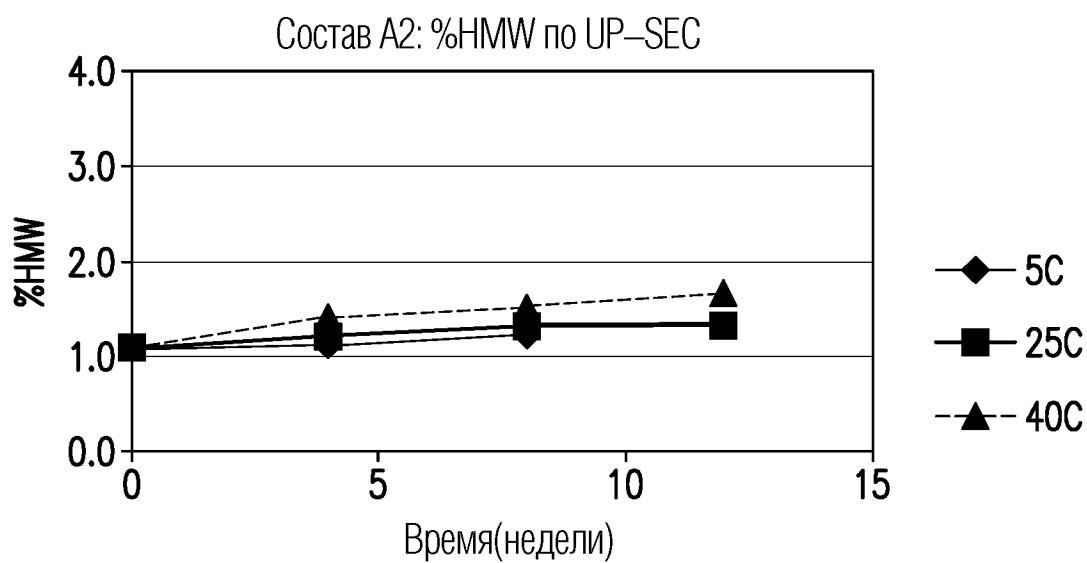
ФИГ. 1В



ФИГ. 2

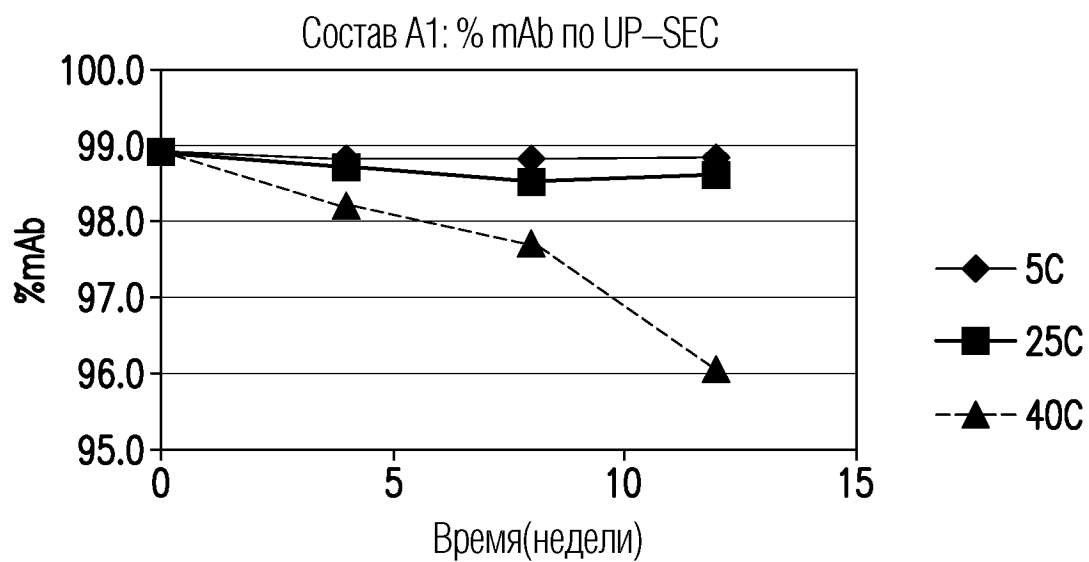


ФИГ. 3А

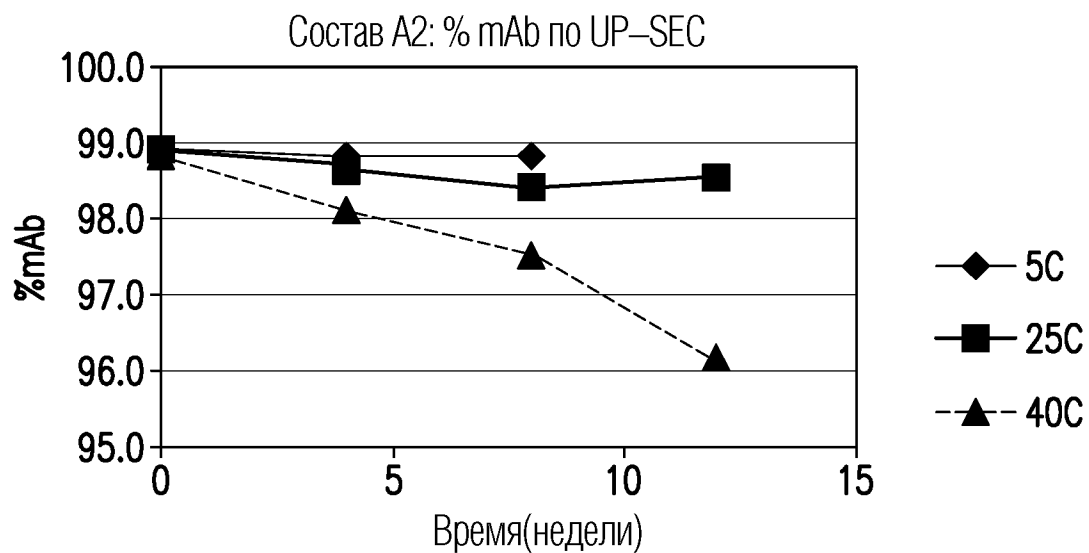


ФИГ. 3В

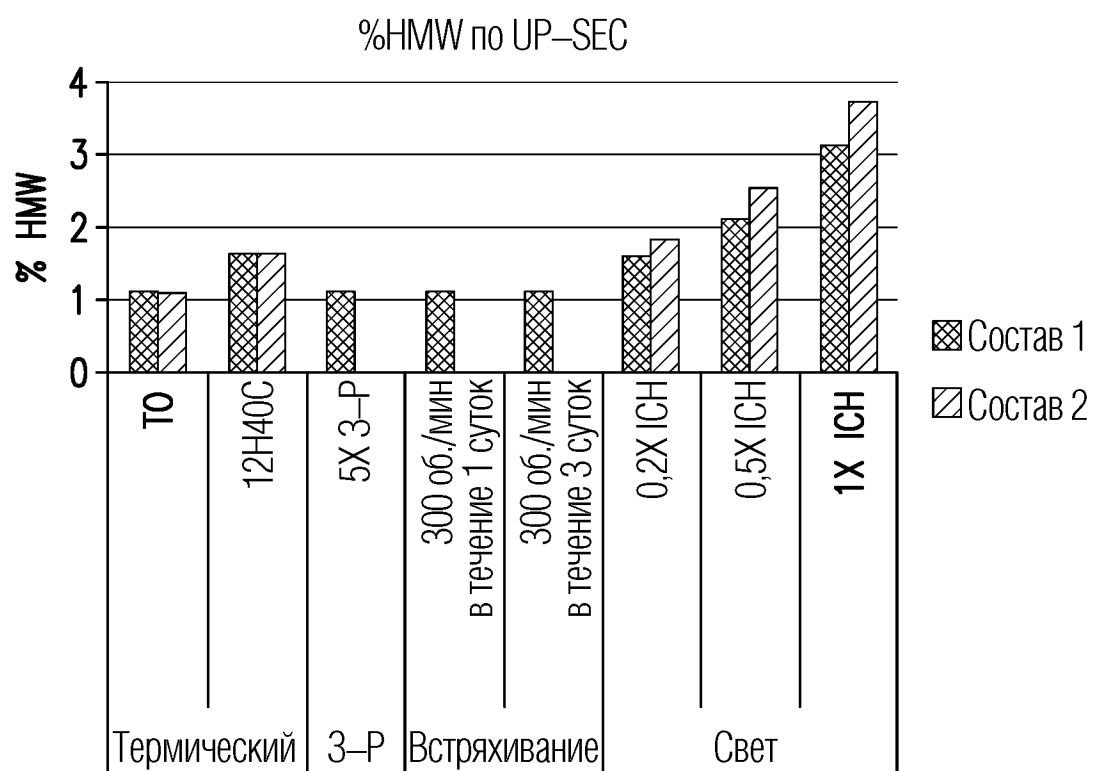
4/27



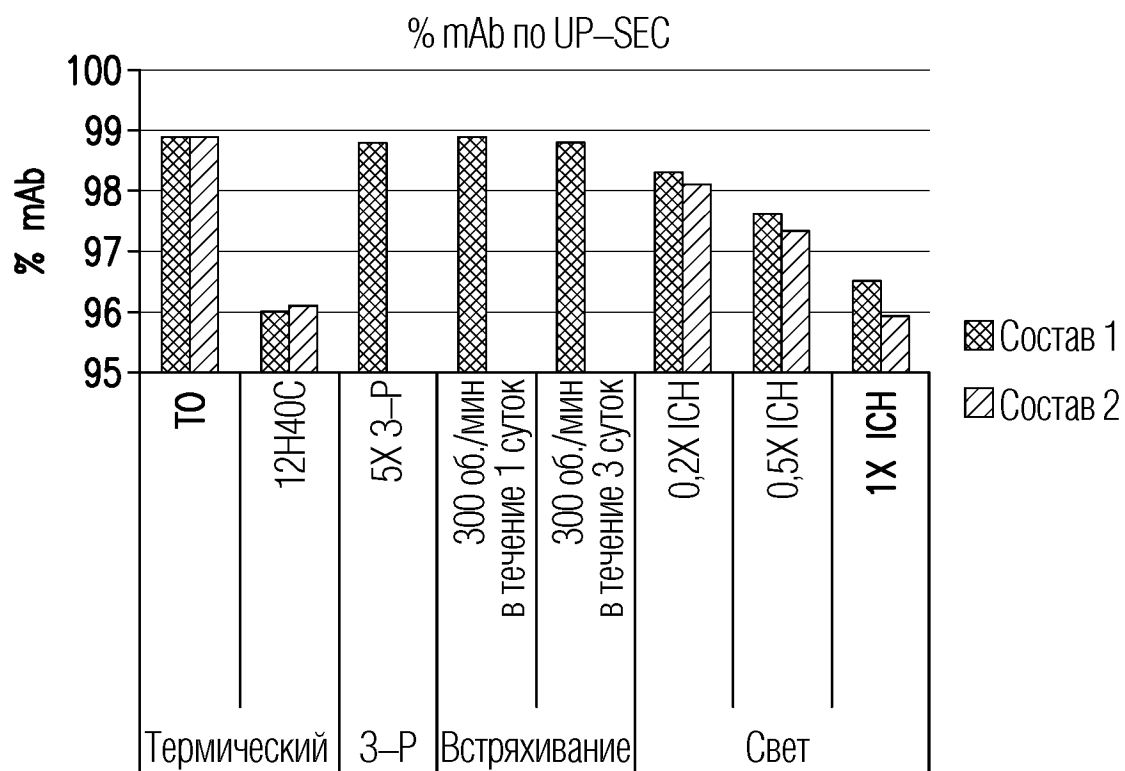
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

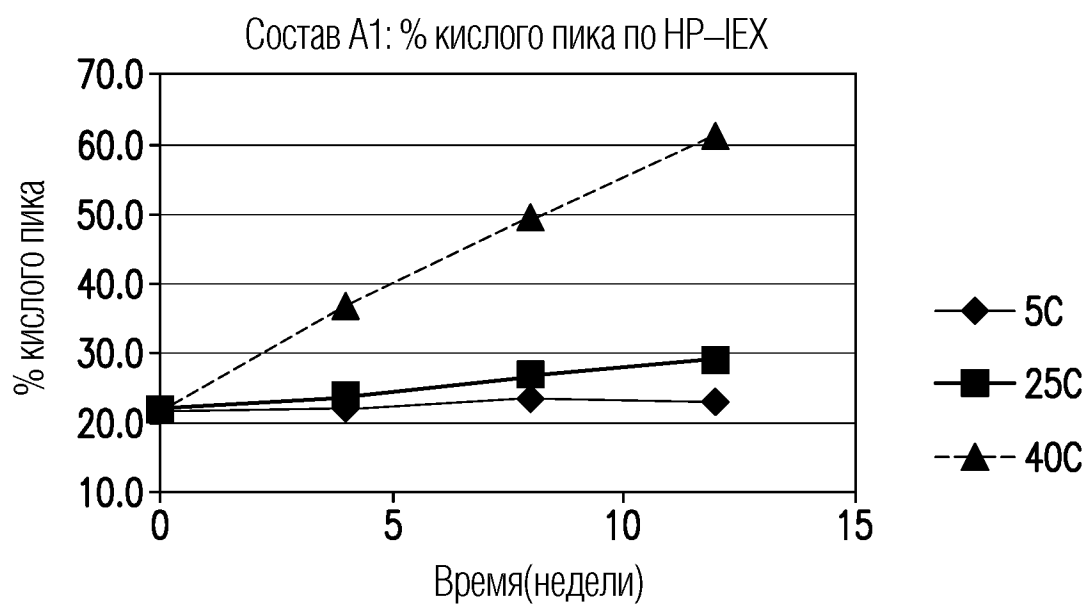


ФИГ. 5

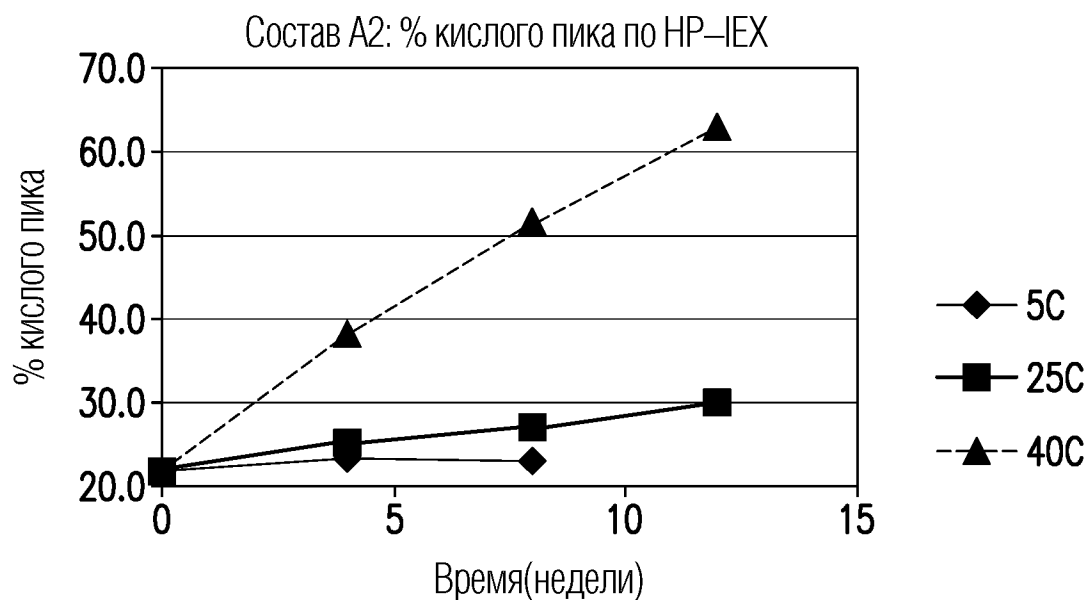


ФИГ. 6

7/27

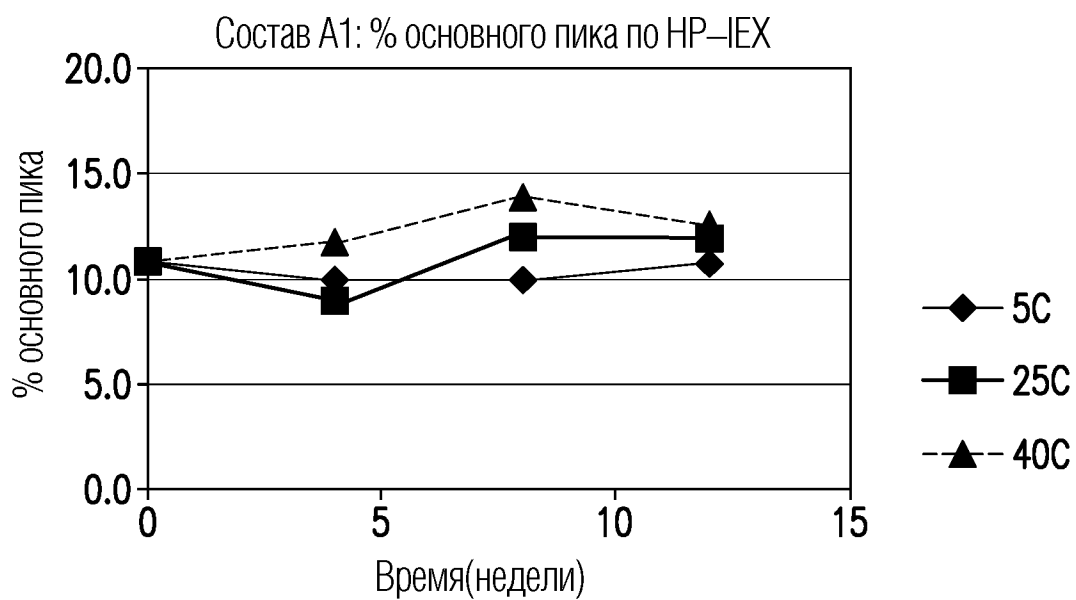


ФИГ. 7А

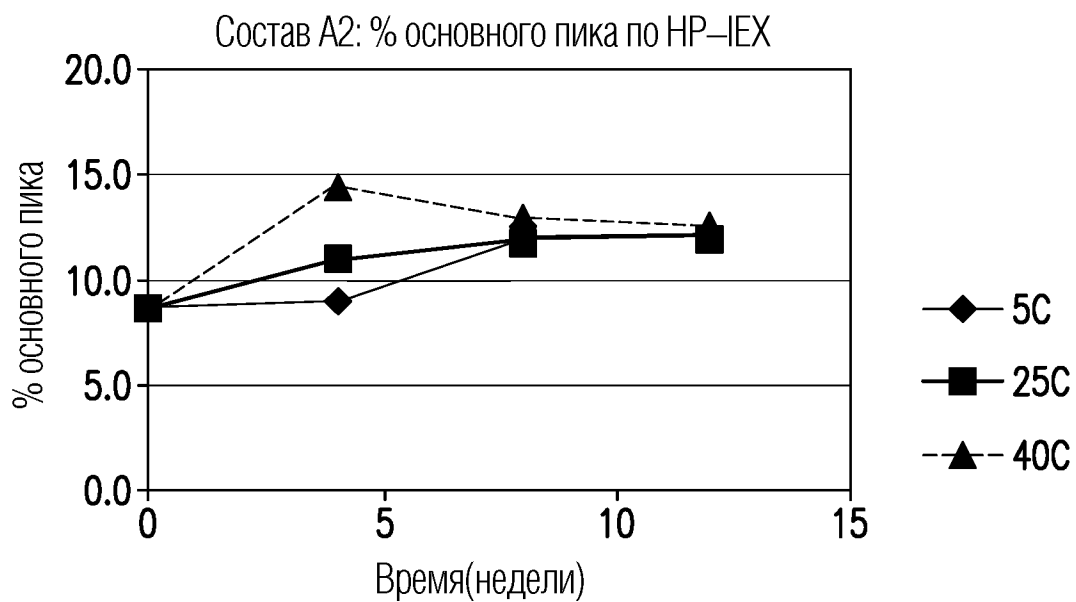


ФИГ. 7В

8/27

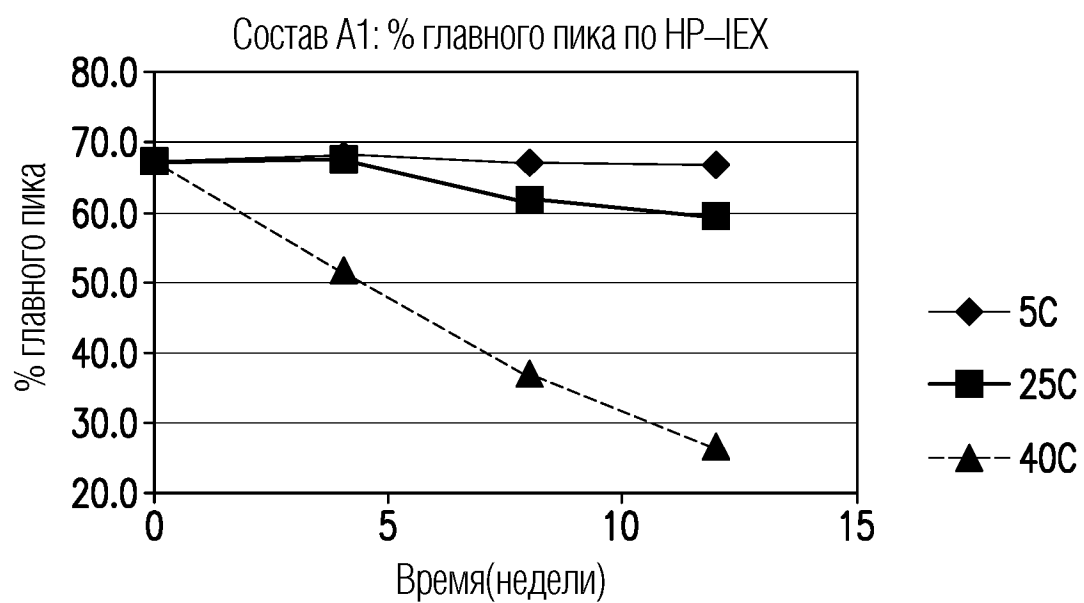


ФИГ. 8А

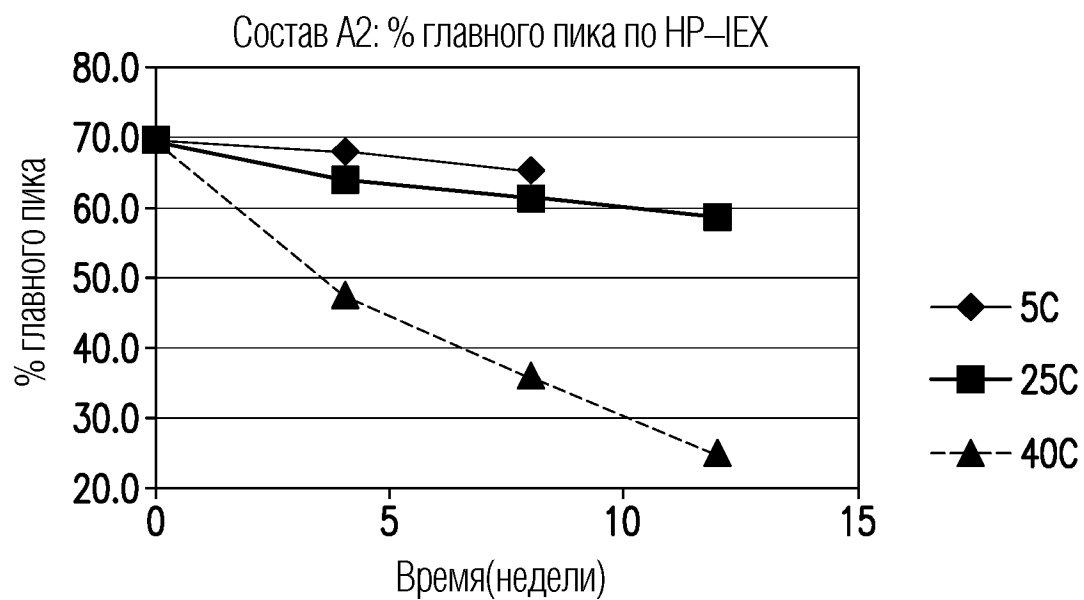


ФИГ. 8В

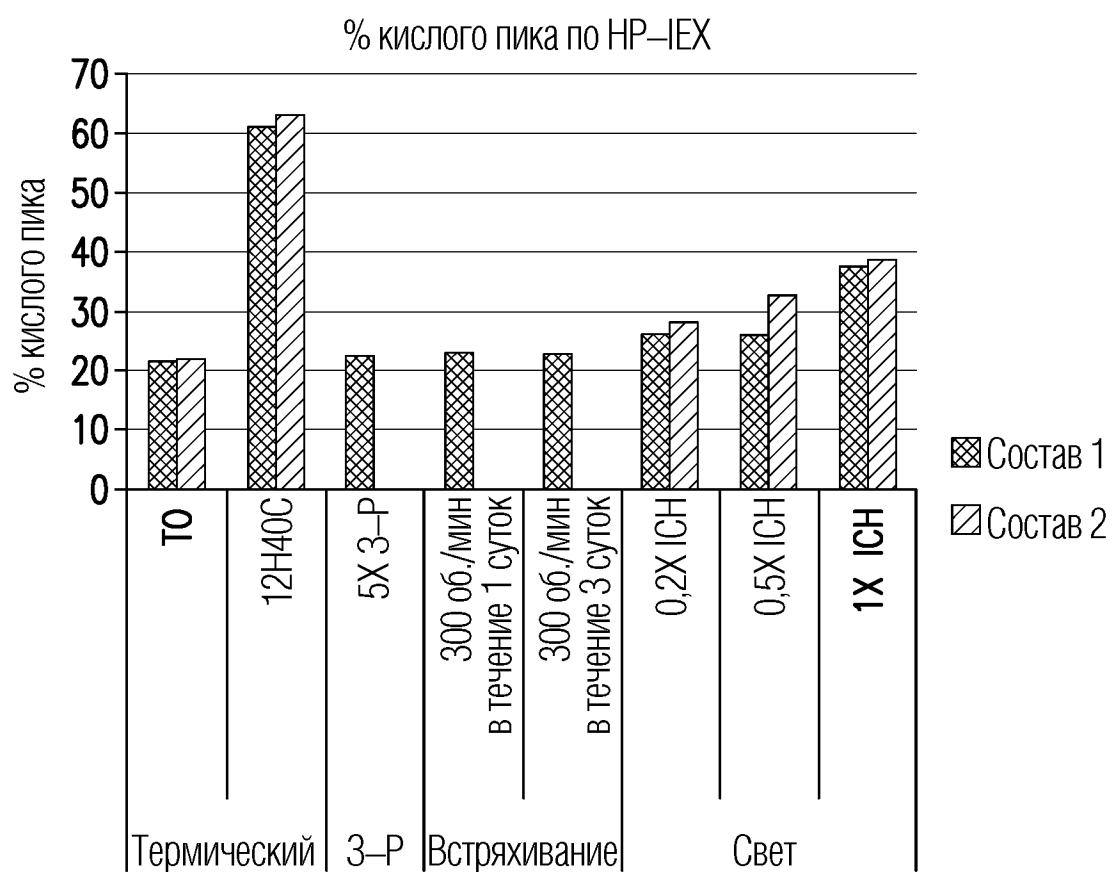
9/27

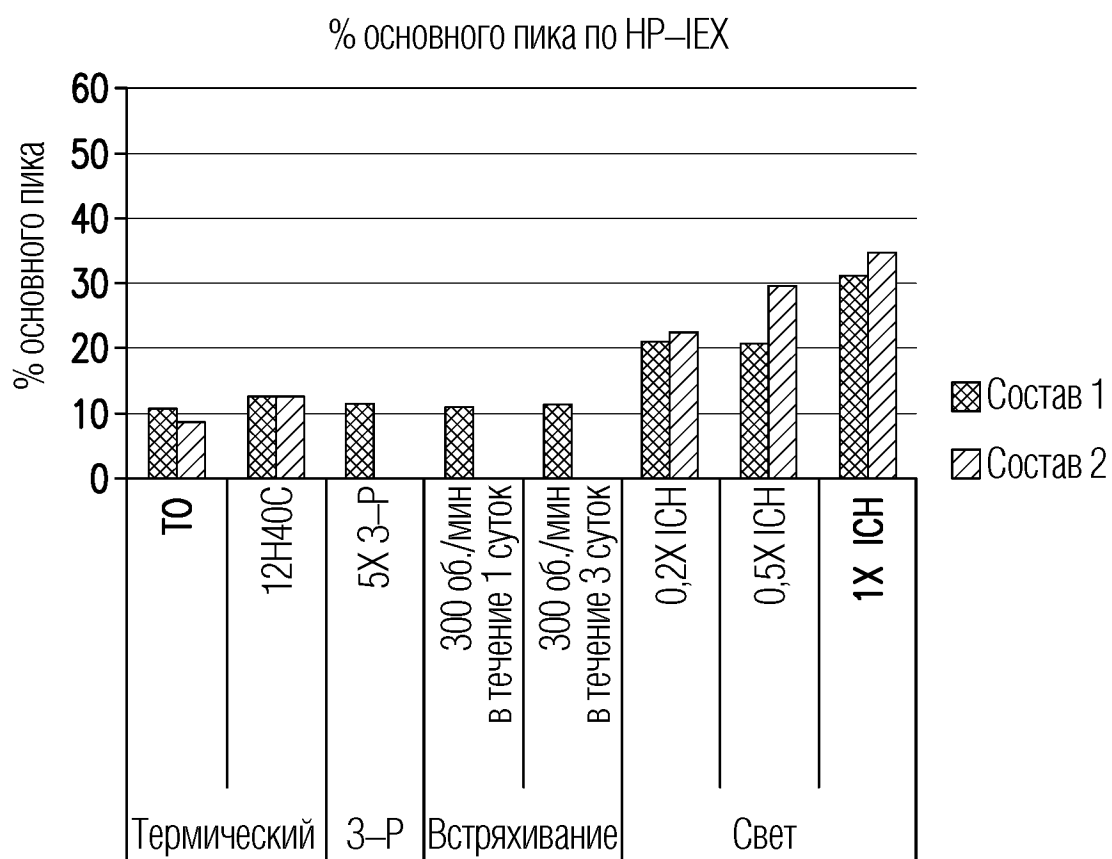


ФИГ. 9А



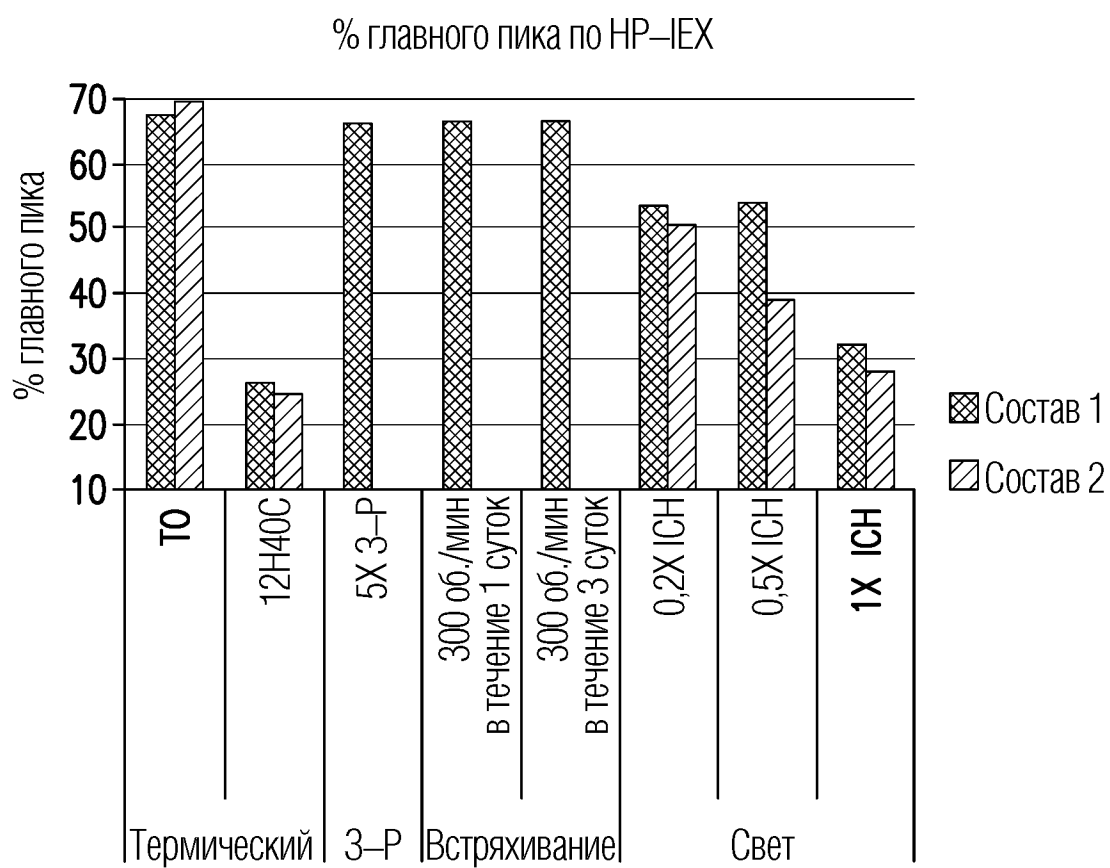
ФИГ. 9В



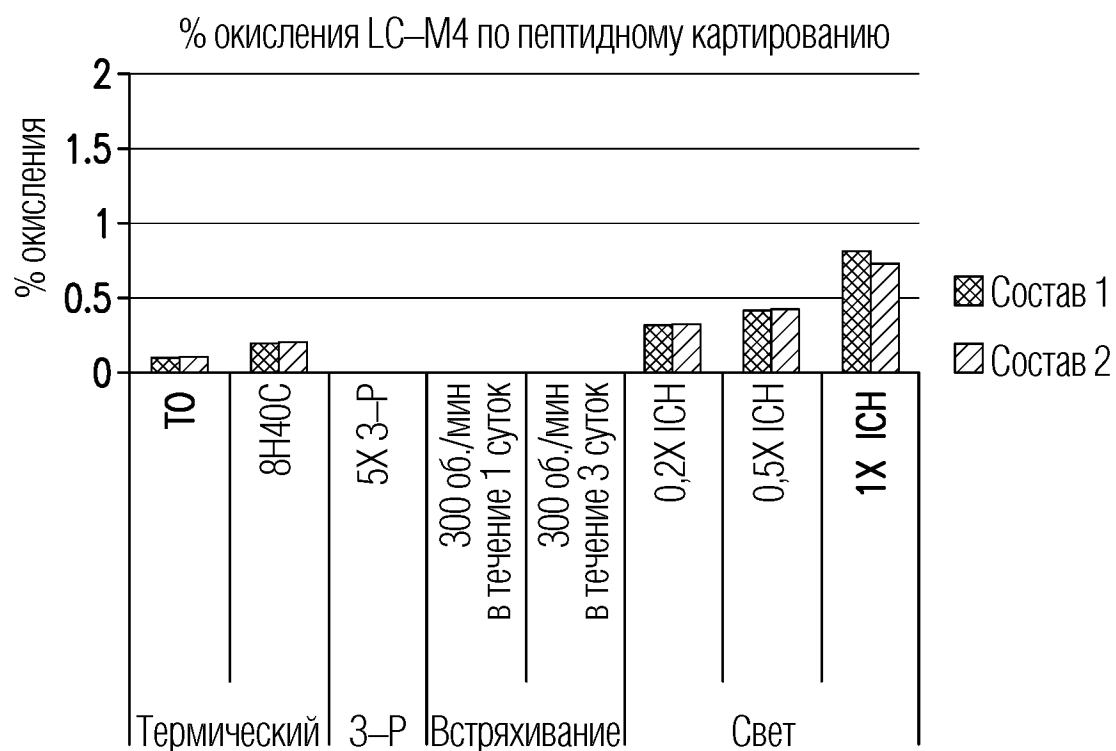


ФИГ. 11

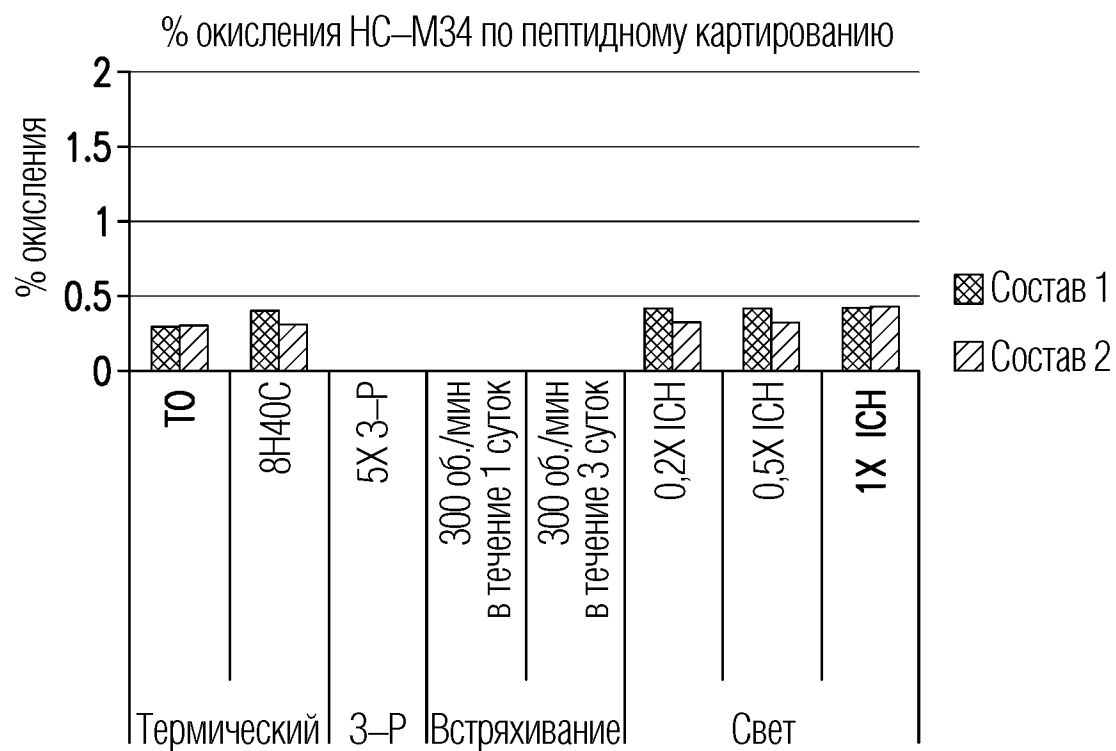
12/27



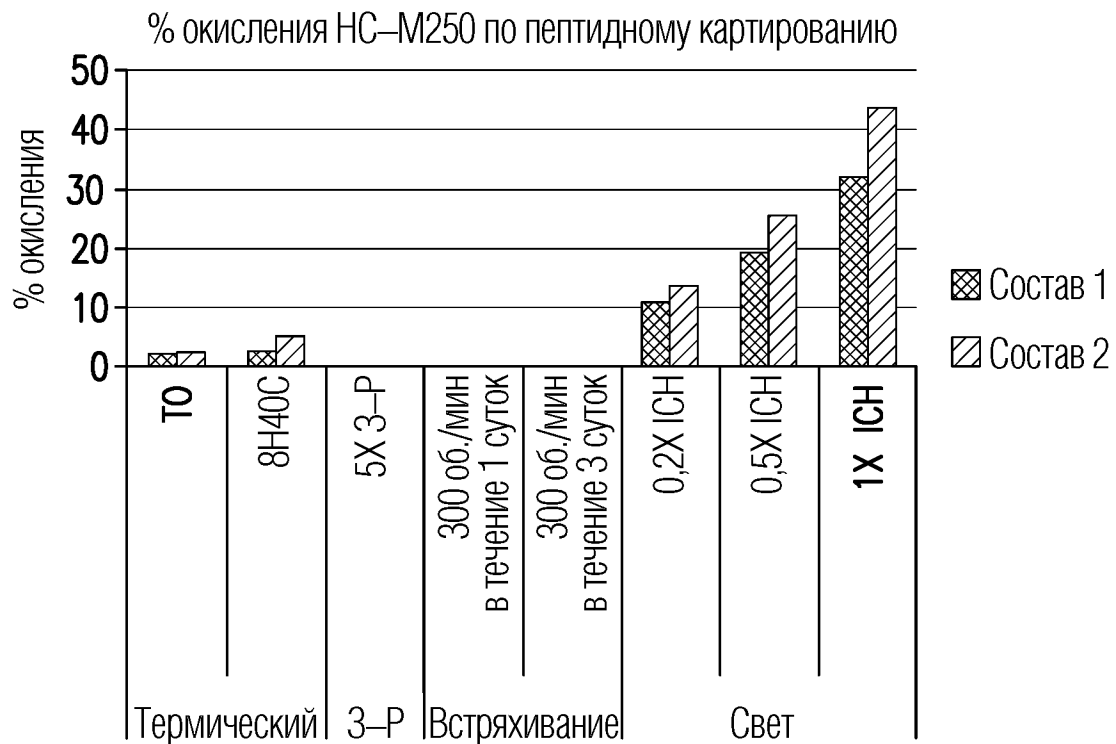
ФИГ. 12



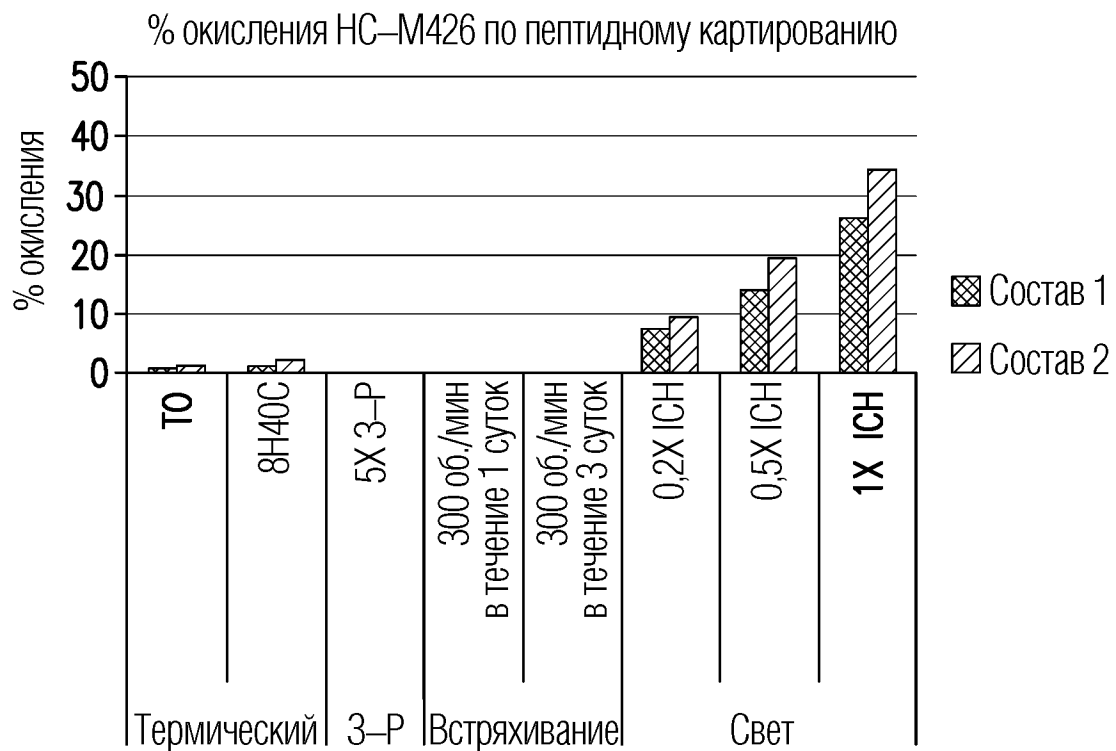
ФИГ. 13



ФИГ. 14

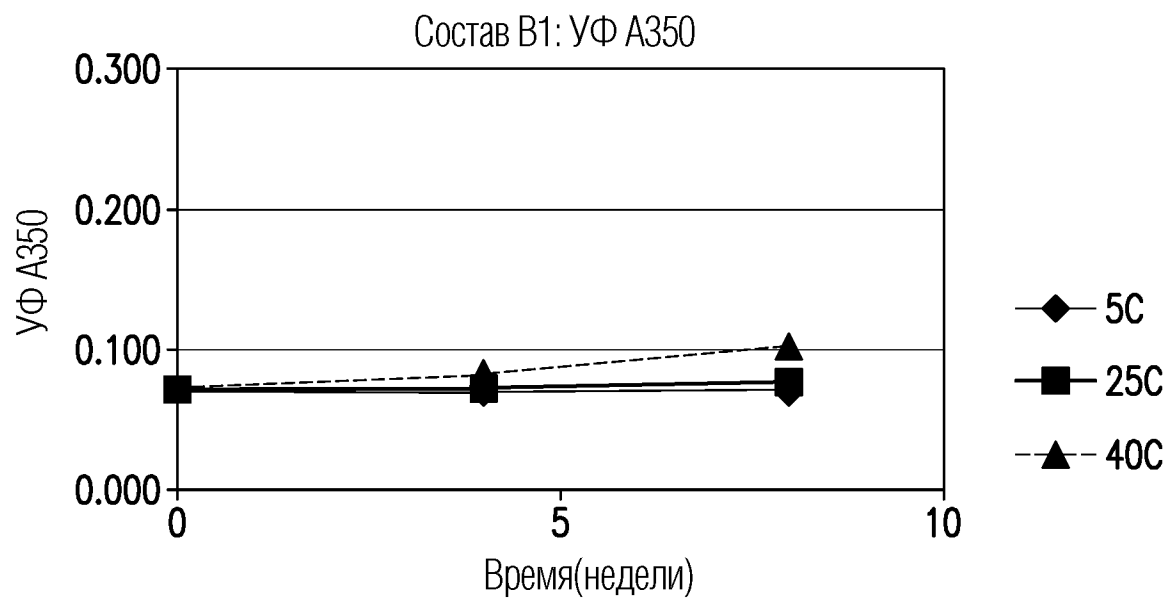


ФИГ. 15

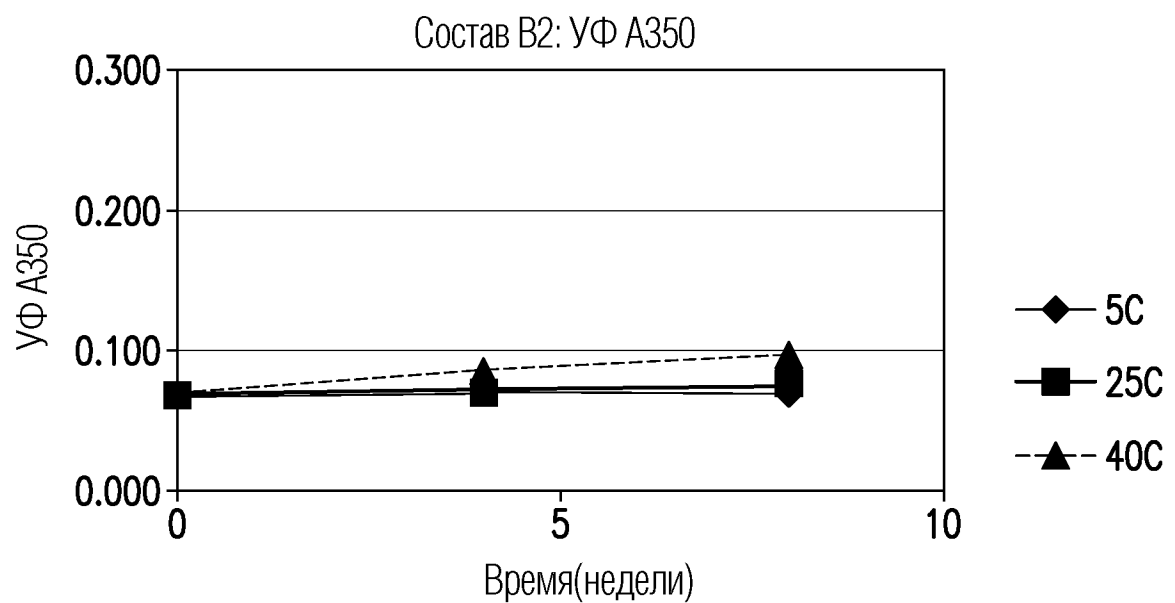


ФИГ. 16

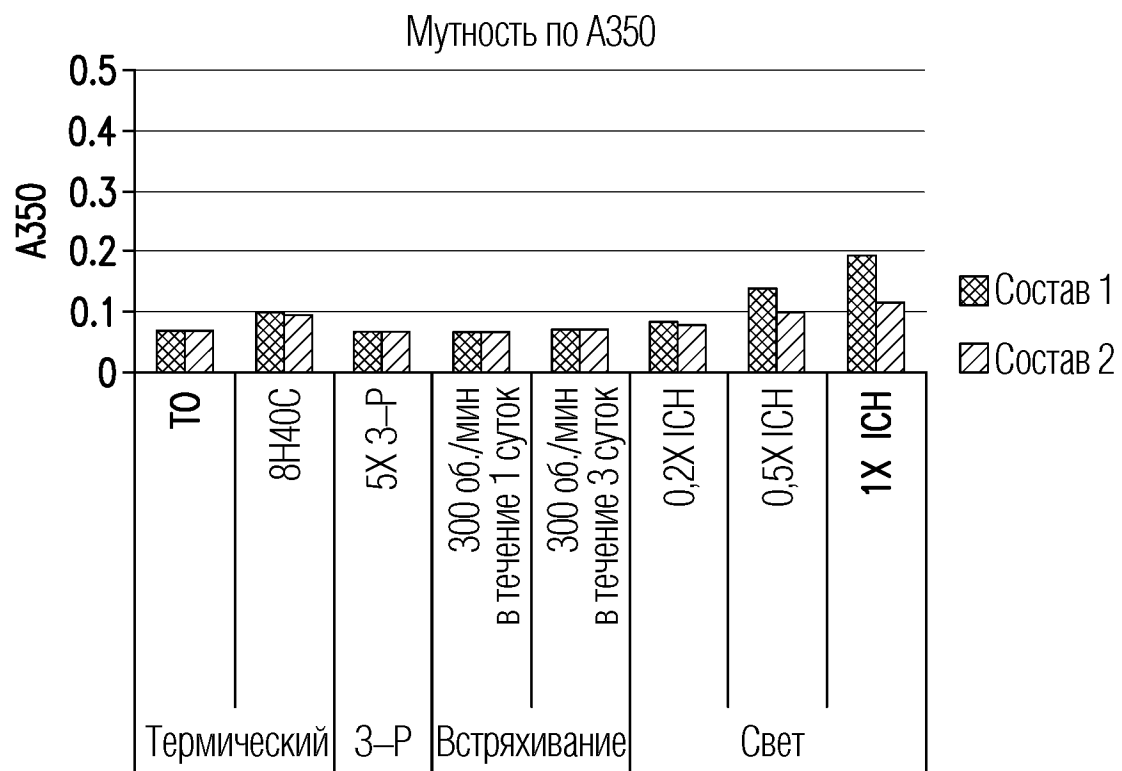
15/27



ФИГ. 17А

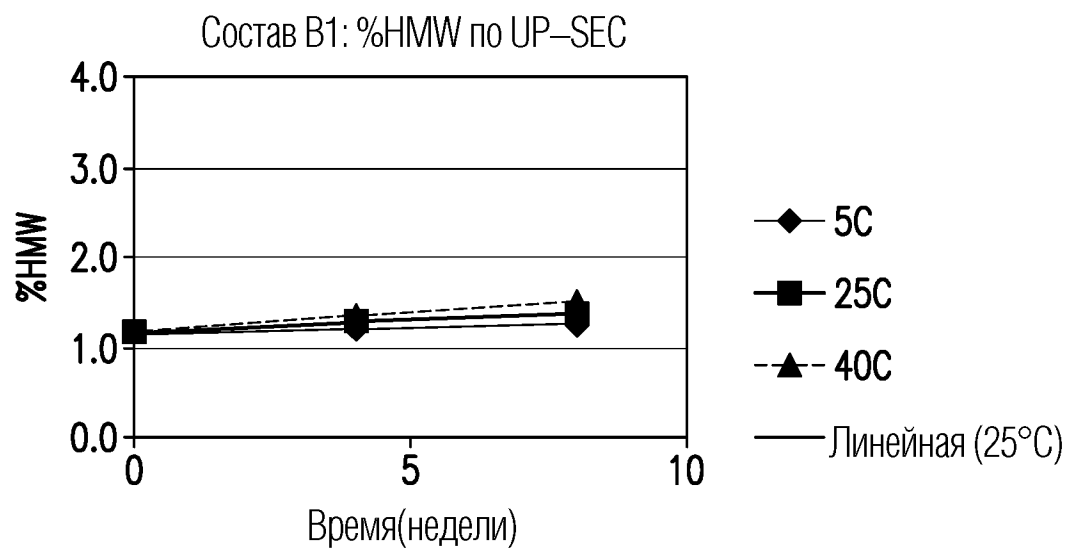


ФИГ. 17В

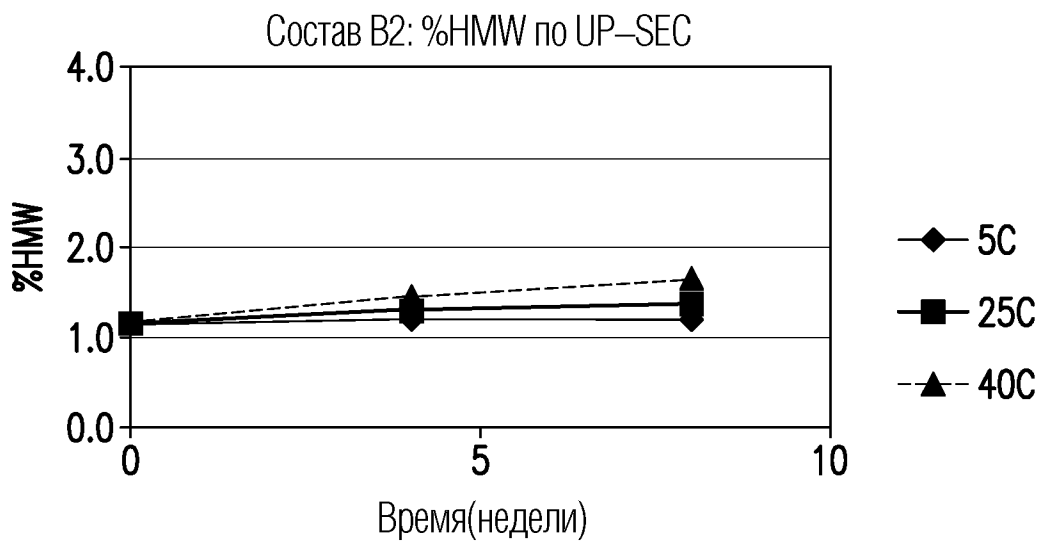


ФИГ. 18

17/27

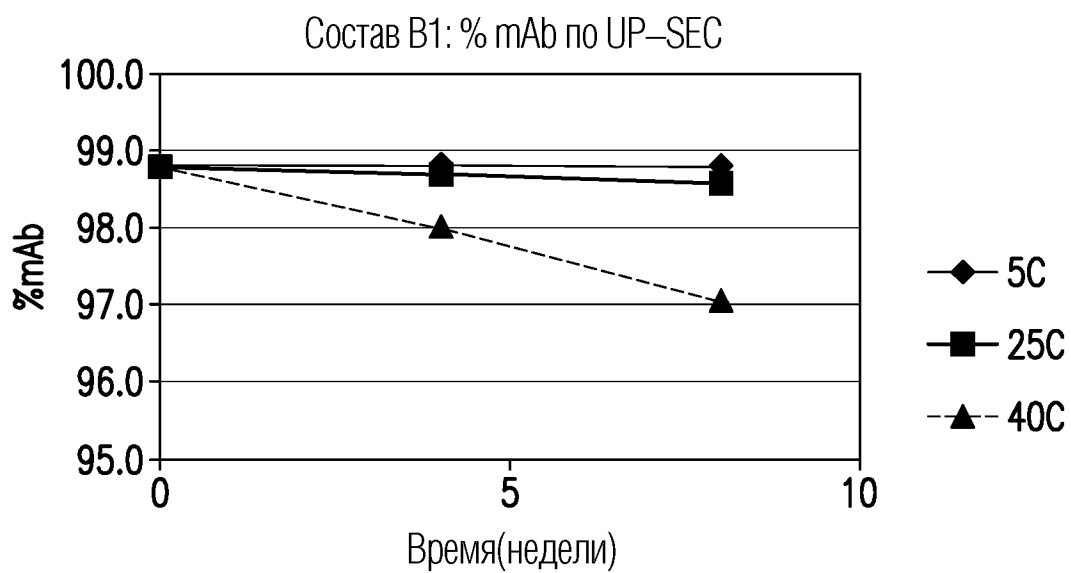


ФИГ. 19А

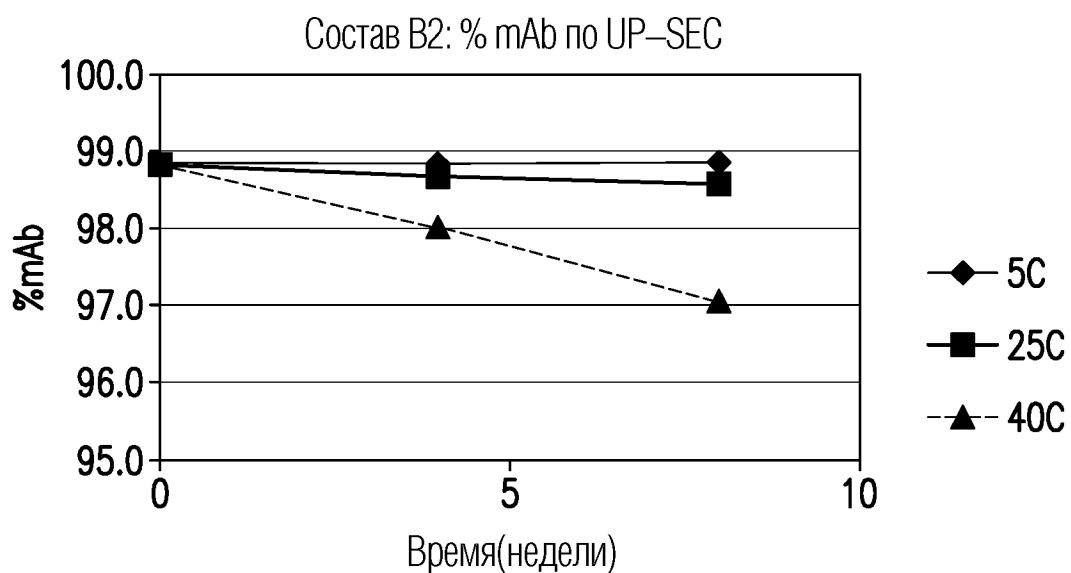


ФИГ. 19В

18/27

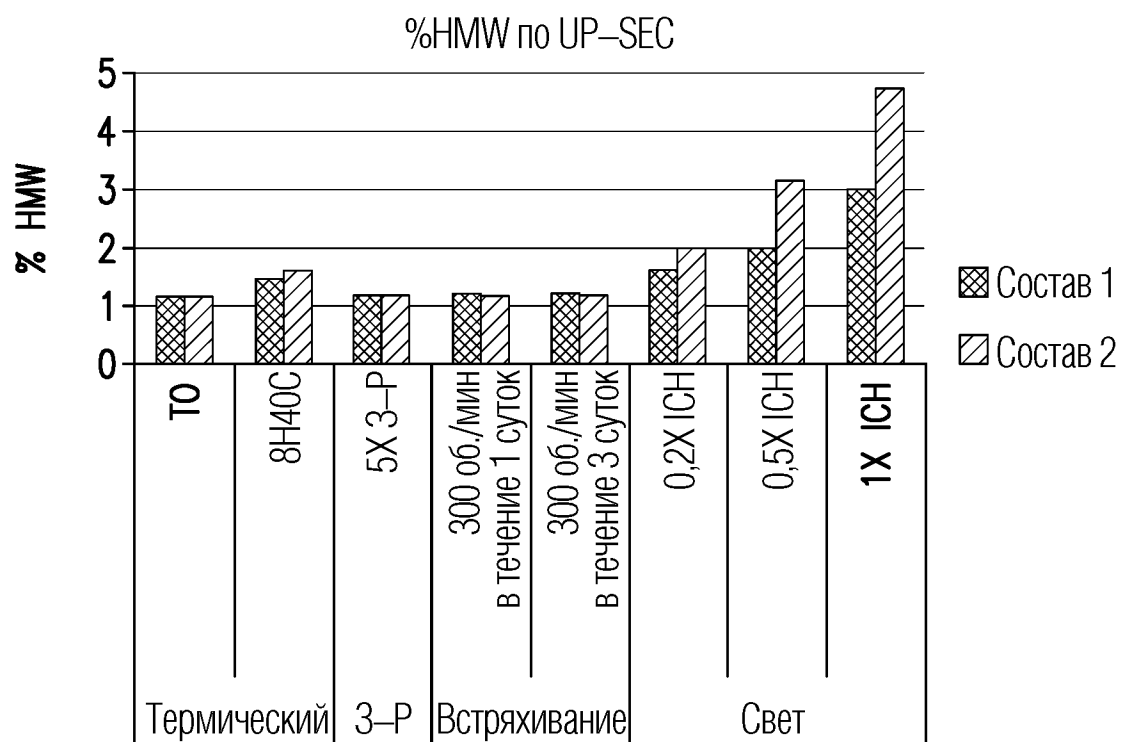


ФИГ. 20А

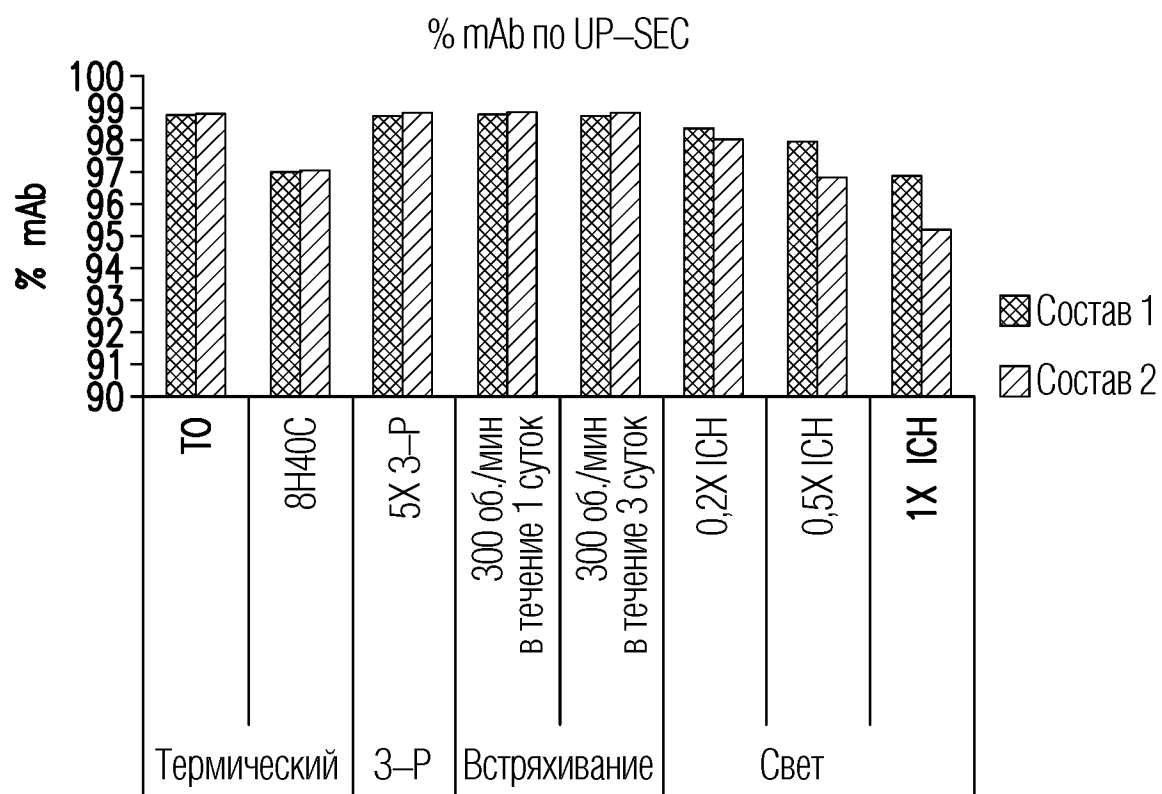


ФИГ. 20В

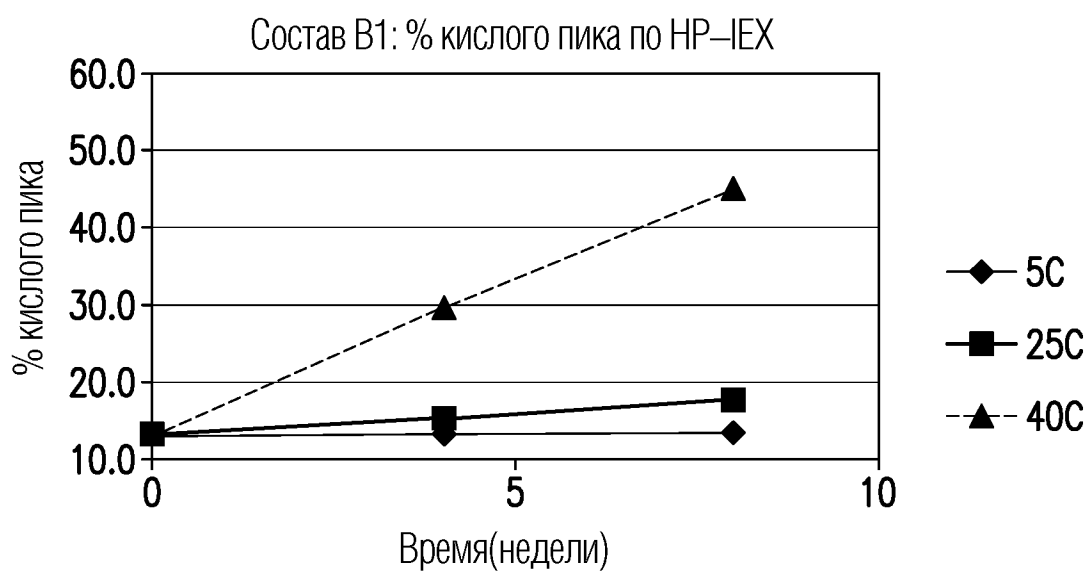
19/27



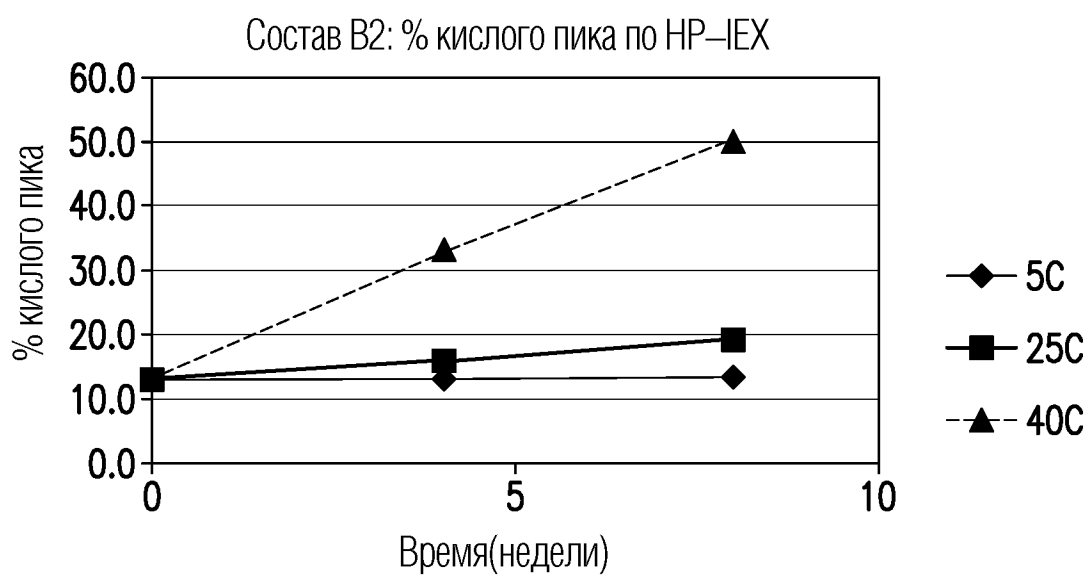
ФИГ. 21



ФИГ. 22

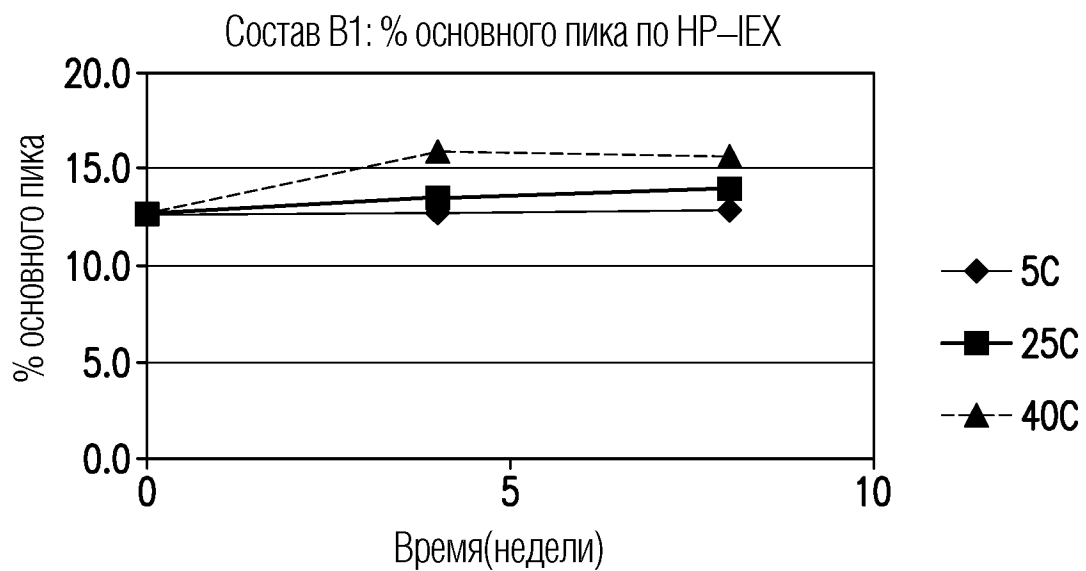


ФИГ. 23А

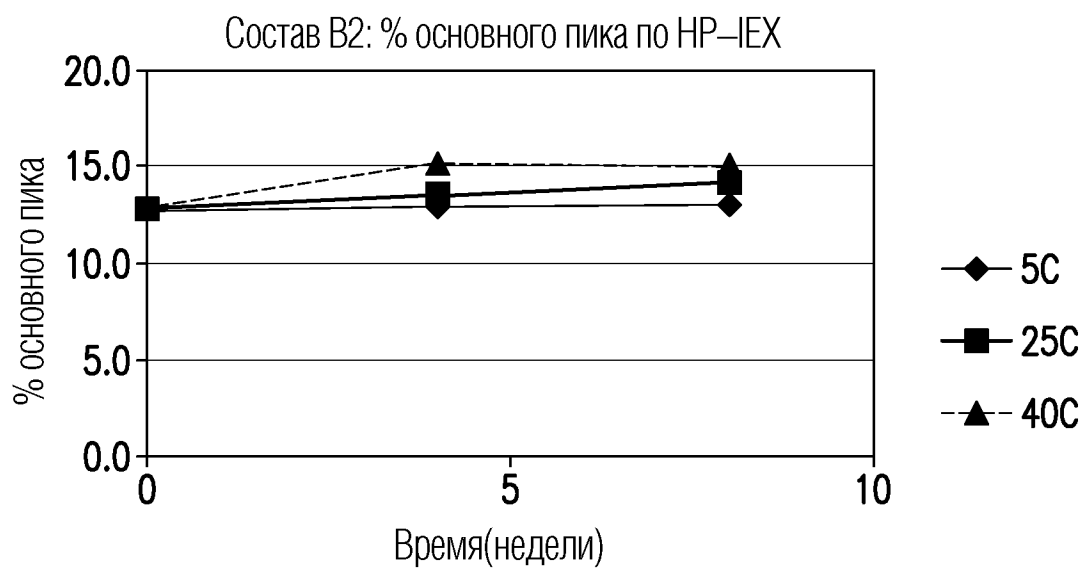


ФИГ. 23В

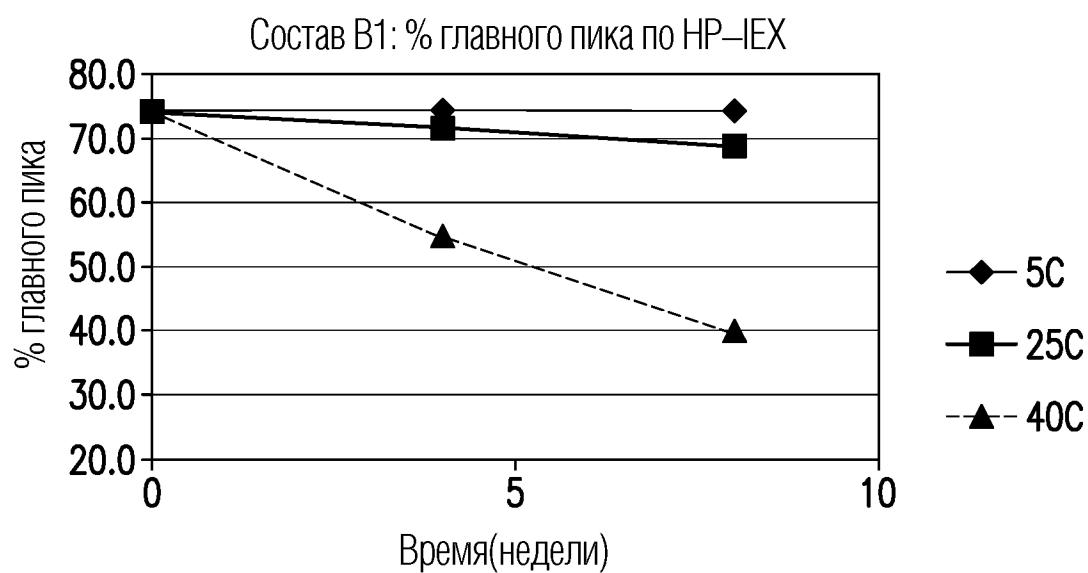
21/27



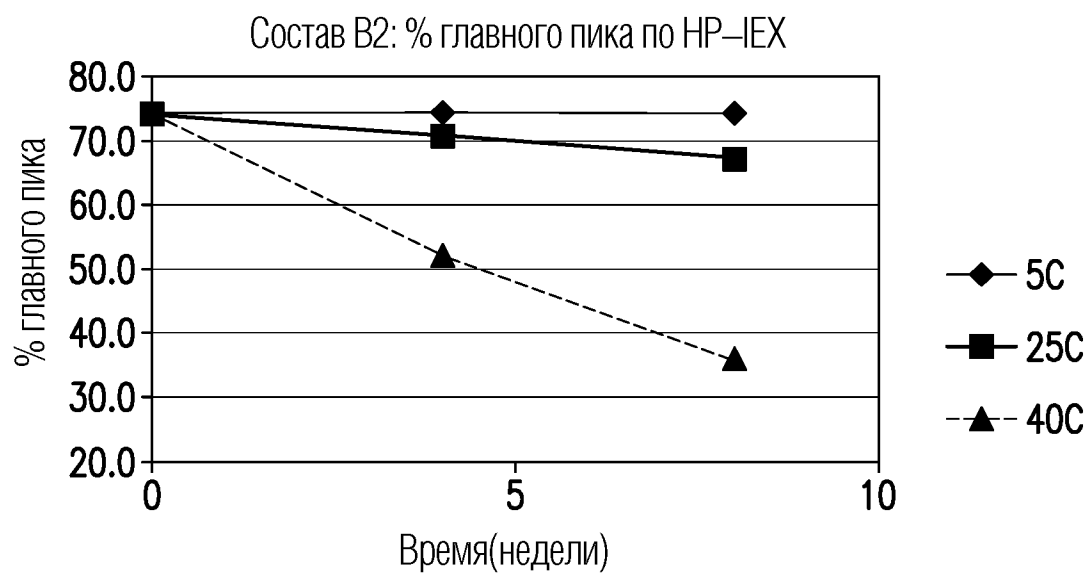
ФИГ. 24А



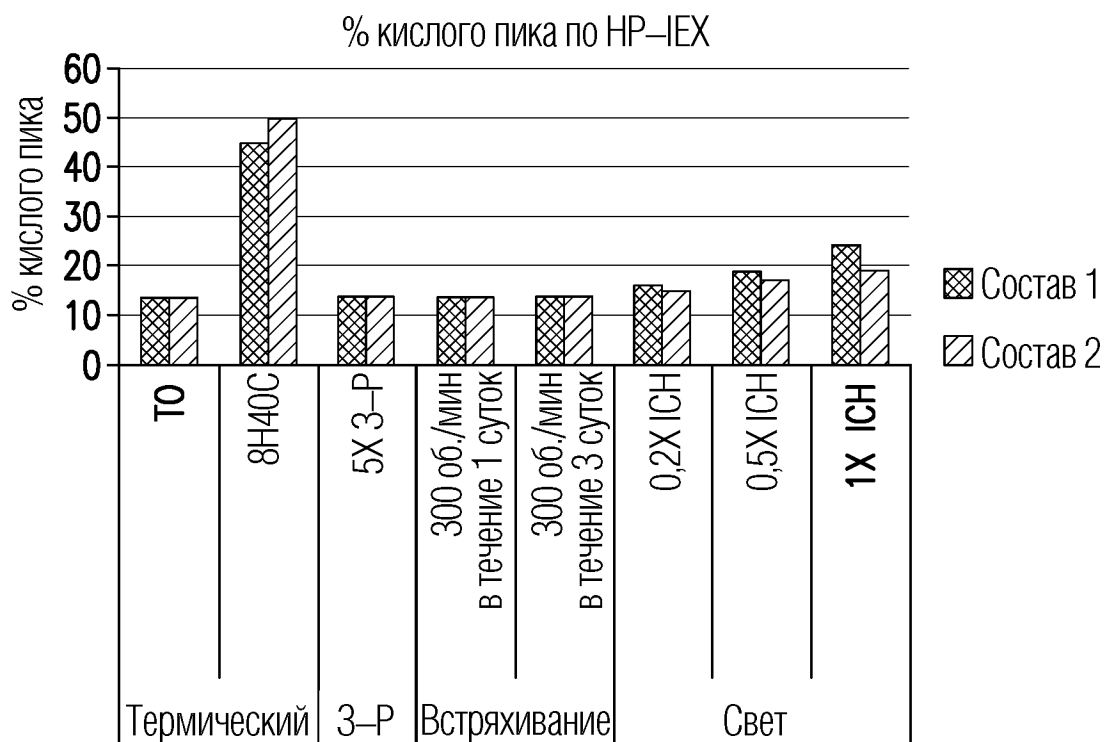
ФИГ. 24В



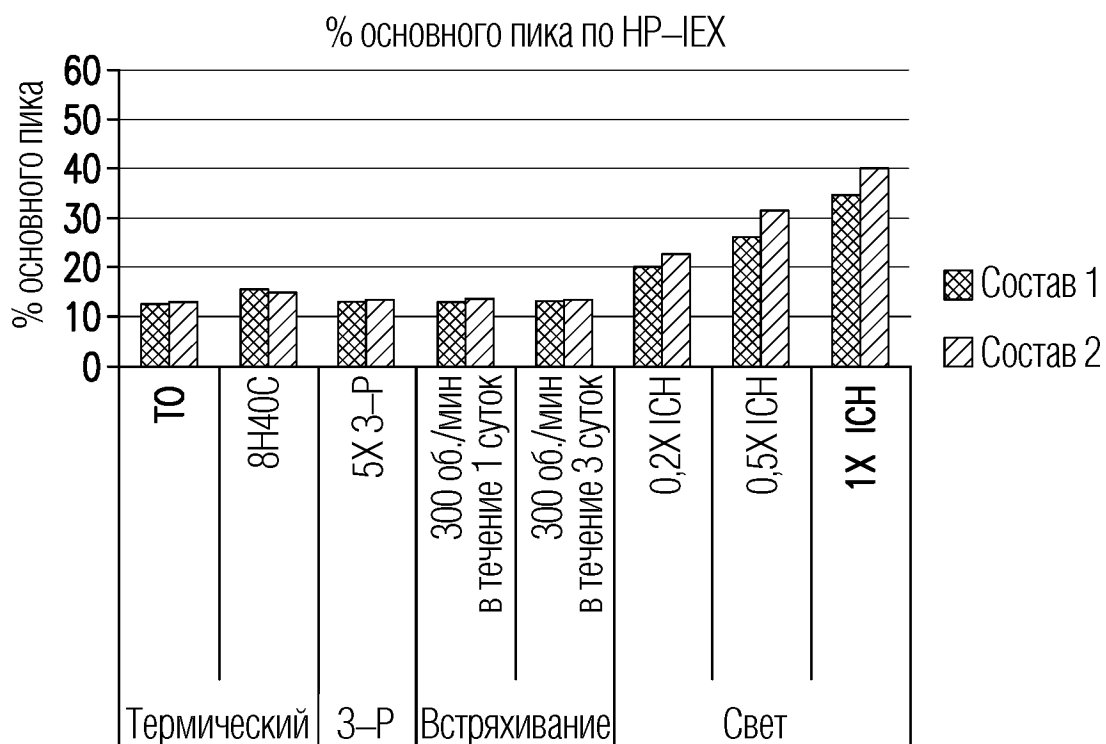
ФИГ. 25А



ФИГ. 25В

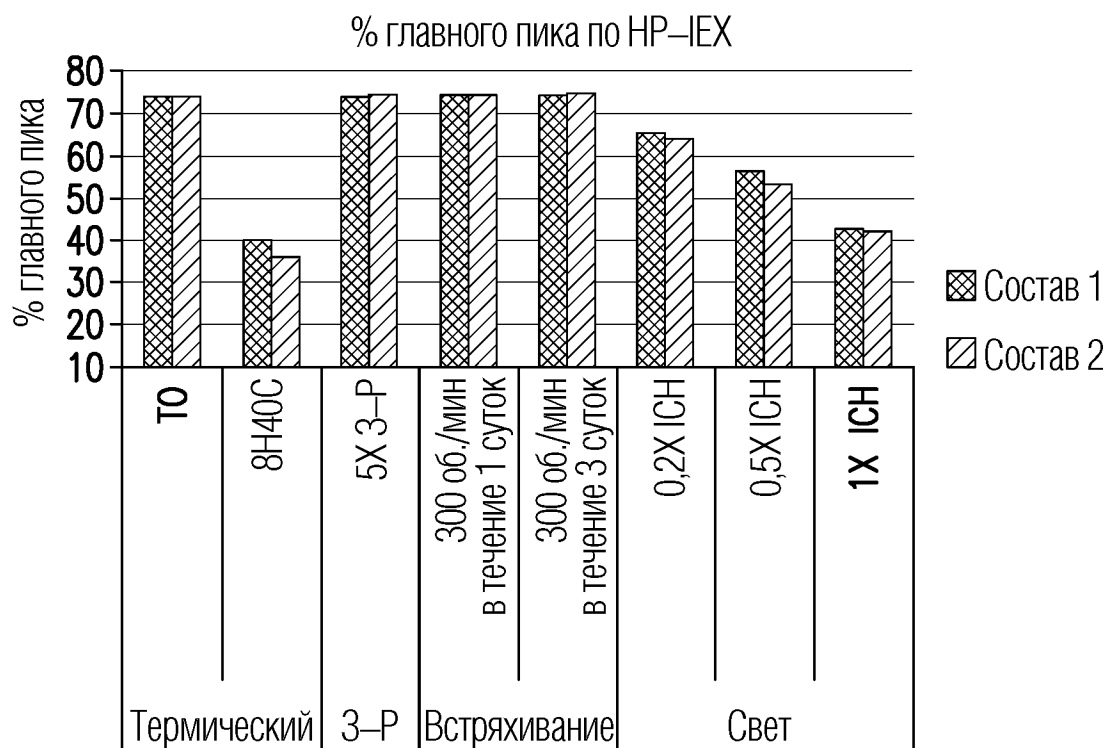


ФИГ. 26

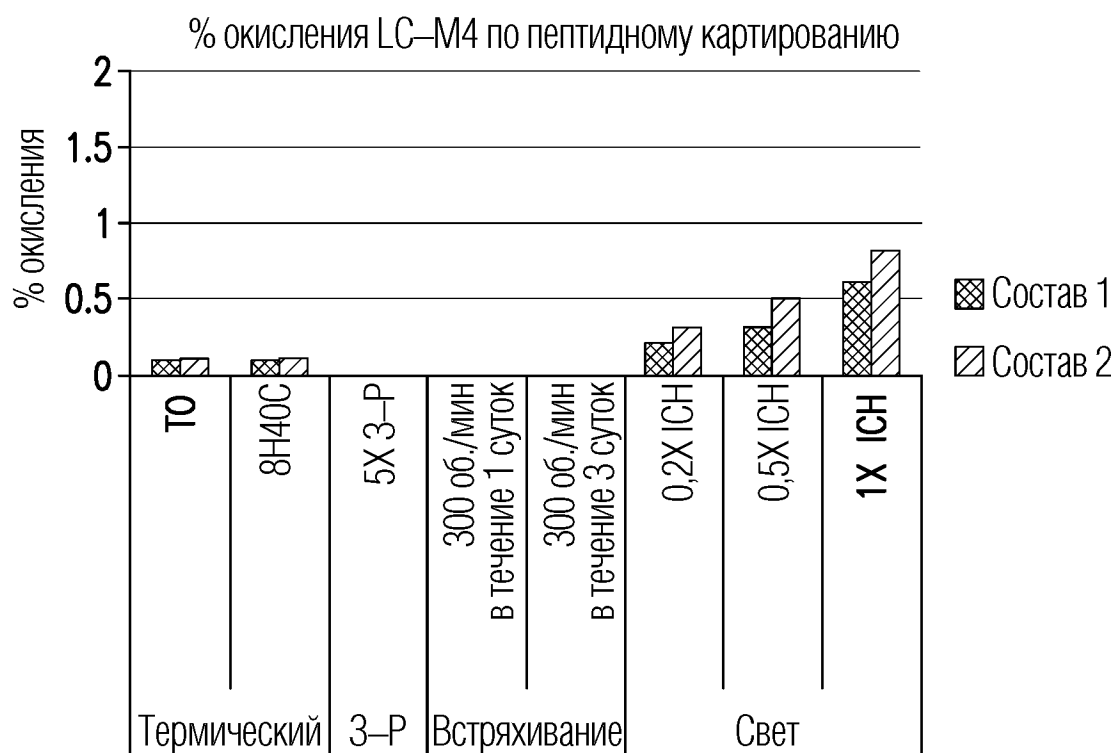


ФИГ. 27

24/27



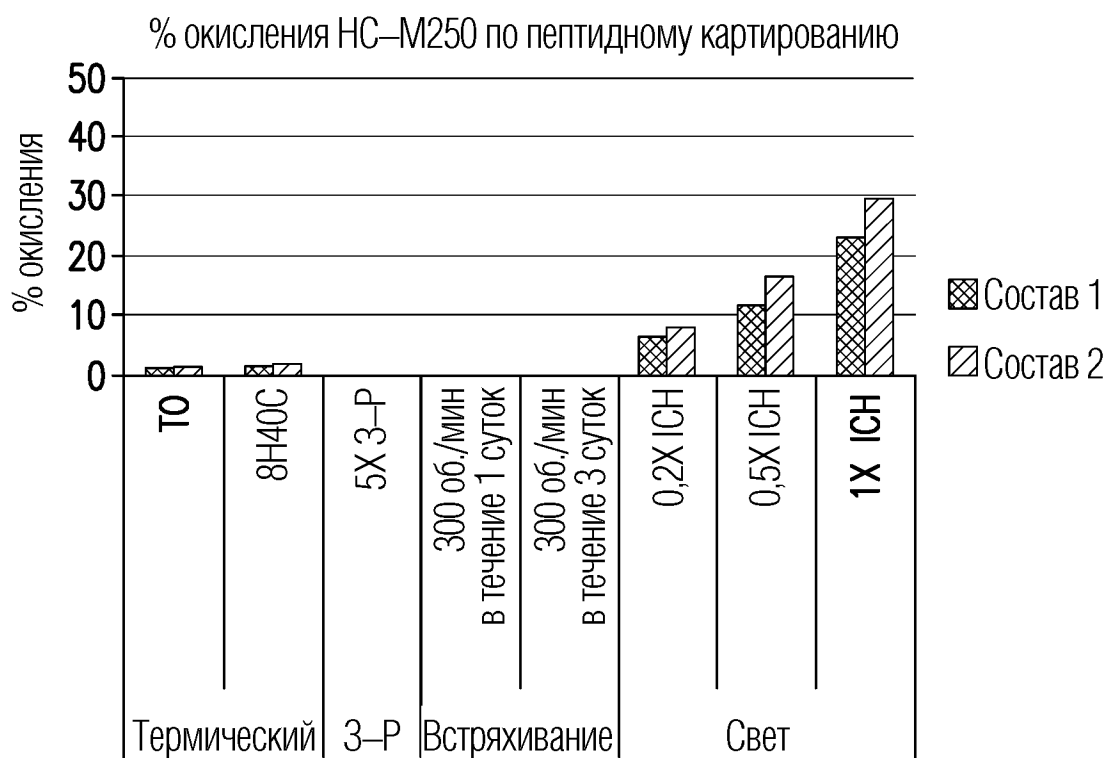
ФИГ. 28



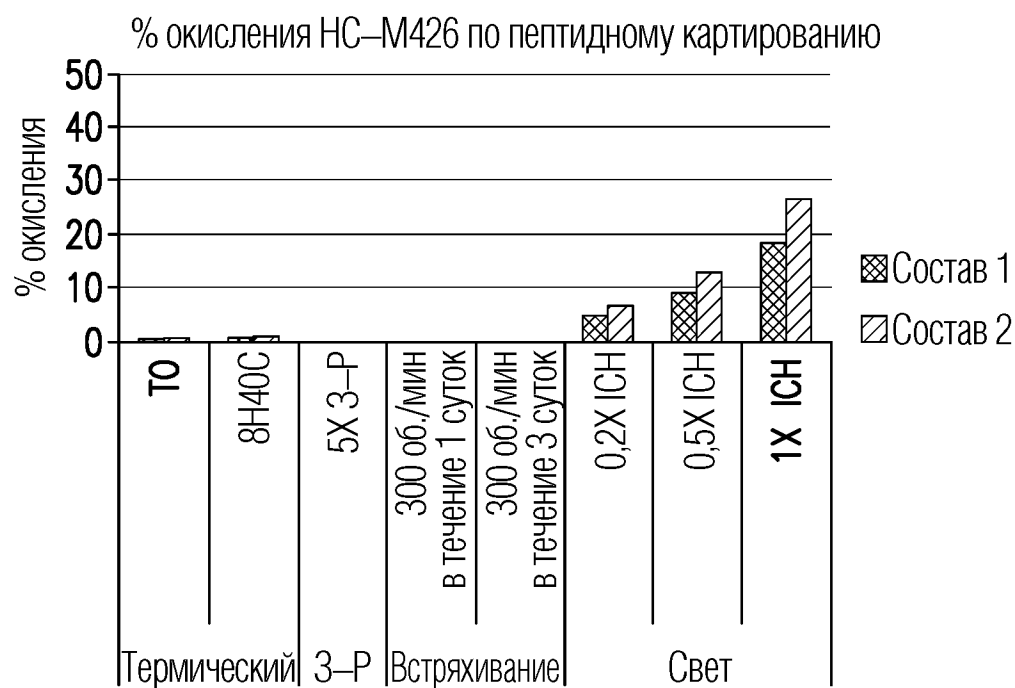
ФИГ. 29



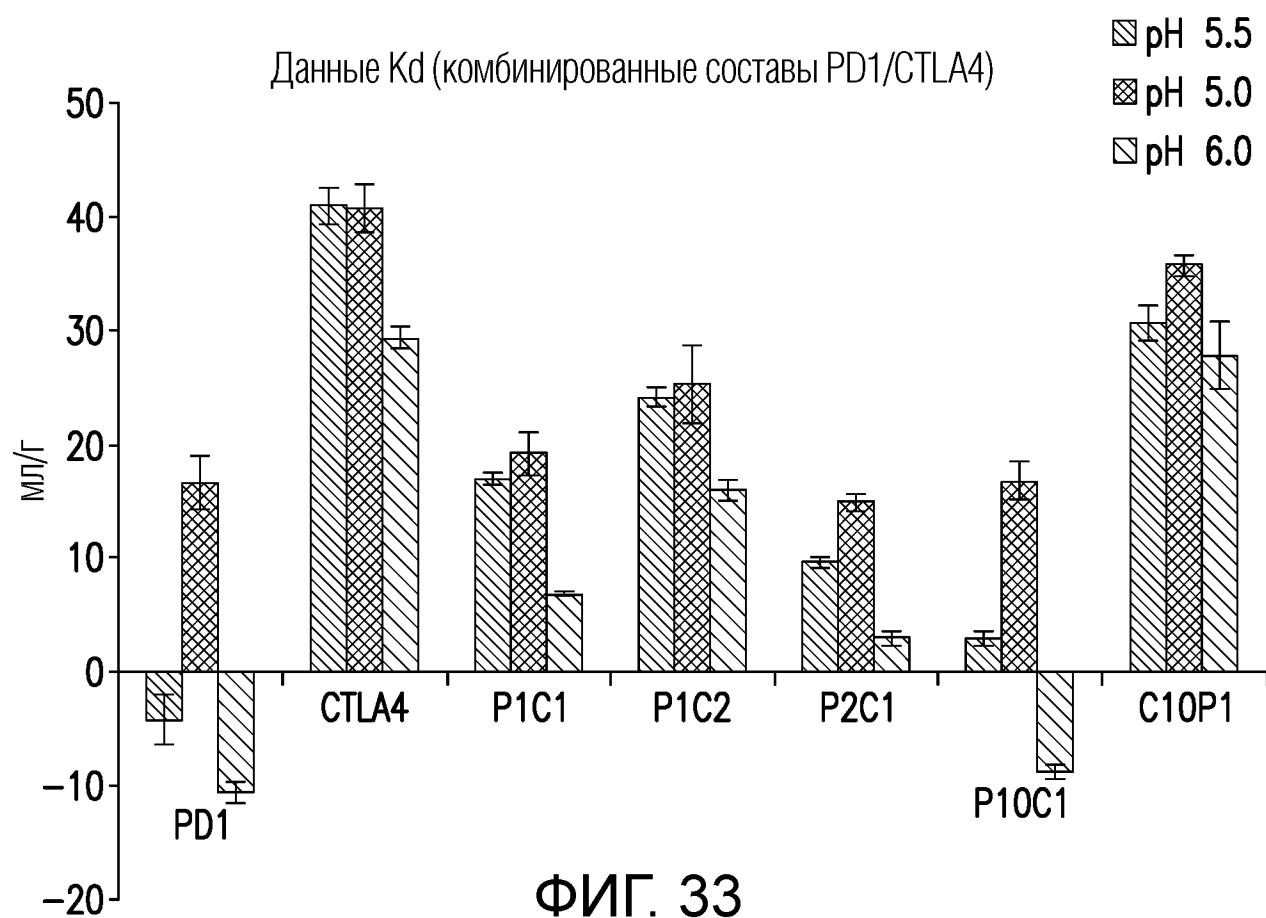
ФИГ. 30



ФИГ. 31



ФИГ. 32



ФИГ. 33

Ипилимумаб

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 84)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWTF
ISYDGNNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFDYWQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

Легкая цепь (SEQ ID NO: 85)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTVKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KUYACEVTHQ
GLSSPVTKSF NRGEC

ФИГ. 34