

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992590** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.08

(22) Дата подачи заявки
2018.05.01

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) СТАБИЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ 1 (PD-1) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/500,238**

(32) **2017.05.02**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/030459**

(87) **WO 2018/204368 2018.11.08**

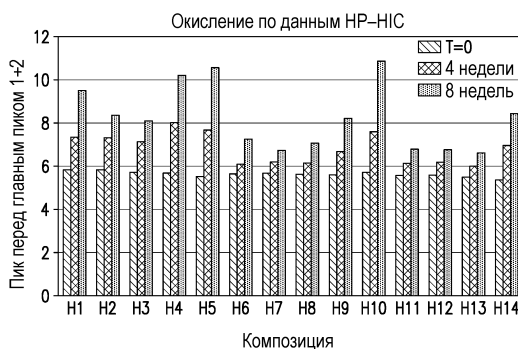
(71) Заявитель:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)

(72) Изобретатель:

**Шарма Манодж К., Бенджамин
Уэнди, Миттал Сарита, Басаркар
Ашвин, Нарасимхан Чакраварти
Начу, Каши Рамеш С., Шамим
Мохаммед, Бхаттачарья Суменду,
Форрест Уильям П., мл.,
Кришнамахари Йогита (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к стабильным композициям антител к человеческому рецептору программируемой гибели PD-1 или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают 5-200 мг/мл анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Настоящее изобретение также относится к способам лечения различных раковых заболеваний стабильными композициями по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению композиции вводят пациенту путем внутривенного или подкожного введения.



A1

201992590

201992590

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559731ЕА/23

СТАБИЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ 1 (PD–1) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к стабильным композициям, включающим антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим рецептором программируемой гибели 1 (PD–1). Изобретение также относится к способам лечения различных видов рака и хронических инфекций композициями по настоящему изобретению.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент США с серийным номером 62/500238, поданной 2 мая 2017 года, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Список последовательностей настоящей заявки представлен в электронном виде через EFS–Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла “24439WOPCT–SEQLIST–26 APRIL2018.TXT”, с датой создания 26 апреля 2018 года и размером 33,3 КБ. Этот перечень последовательностей, представленный через EFS–Web, является частью описания и включен в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терапии на основе иммунных контрольных точек, целенаправленно воздействующие на ось рецептора–1 программируемой гибели (PD–1), привели к принципиально новым улучшениям клинического ответа при множественных раковых заболеваниях человека (Brahmer et al., N Engl J Med 2012, 366: 2455–65; Garon et al. N Engl J Med 2015, 372: 2018–28; Hamid et al., N Engl J Med 2013, 369: 134–44; Robert et al., Lancet 2014, 384: 1109–17; Robert et al., N Engl J Med 2015, 372: 2521–32; Robert et al., N Engl J Med 2015, 372: 320–30; Topalian et al., N Engl J Med 2012, 366: 2443–54; Topalian et al., J Clin Oncol 2014, 32: 1020–30; Wolchok et al., N Engl J Med 2013, 369: 122–33). Взаимодействие рецептора PD–1 на Т–клетках с его лигандами, PD–L1 и PD–L2, на опухолевых и иммунных инфильтрирующих клетках регулирует опосредованные Т–клетками иммунные ответы и может играть роль в ускользании клеток опухолей человека от иммунного надзора (Pardoll DM. Nat Rev Cancer 2012,12: 252–64). Связывание PD–1 с любым из его лигандов приводит к доставке ингибирующего стимула к Т–клетке. Иммунотерапии, целенаправленно воздействующие на ось PD–1, включают моноклональные антитела, направленные на рецептор PD–1 (KEYTRUDA™ (пембролизумаб), Merck и Co., Inc., Kenilworth, NJ and OPDIVO™ (ниволумаб), Bristol–Myers Squibb, Princeton, NJ), а также те, которые связываются с лигандом PD–L1

(MPDL3280A; TECENTRIQ™ (атезолизумаб), Genentech, San Francisco, CA). Оба терапевтических подхода продемонстрировали противоопухолевые эффекты в различных типах рака.

Антитела для применения у человека должны храниться перед использованием и транспортироваться к месту введения. Для воспроизводимого достижения желаемого уровня лекарственного средства на основе антител у пациента требуется, чтобы лекарственное средство хранилось в композиции, которая поддерживает биологическую активность лекарственного средства. Существует потребность в стабильных композициях антител против человеческого PD-1 для фармацевтического применения, *например*, для лечения различных раковых и инфекционных заболеваний. Предпочтительно, такие композиции должны обладать длительным сроком годности, быть стабильными при хранении и транспортировке и быть пригодными для введения в высоких концентрациях, например для применения при подкожном введении, а также в низких концентрациях, например для внутривенного введения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающую: а) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; б) от приблизительно 5 mM до приблизительно 20 mM буфера; в) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; (ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L-аргинина, фармацевтически приемлемой соли L-аргинина, L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и (iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли; д) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% неионного поверхностно-активного вещества; и е) приблизительно 1 mM до приблизительно 20 mM антиоксиданта.

В вариантах осуществления настоящего изобретения буфер обеспечивает pH между 5,0 и 6,0.

В конкретных вариантах осуществления стабилизатор композиции антитела к человеческому PD-1 выбран из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; (ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% маннита, сорбита или L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и (iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция антитела к человеческому PD-1 дополнительно включает от приблизительно 1% до приблизительно 3% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: а) от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл антитела

к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; b) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ гистидинового буфера; c) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы; d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% масс/об полисорбата 80; и e) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В конкретных вариантах осуществления композиция антитела к человеческому PD-1 дополнительно включает от приблизительно 1% до приблизительно 3% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: a) от приблизительно 75 до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; b) приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; c) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ метионина; d) приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы; и e) 0,01% до приблизительно 0,04% масс/об полисорбата 80.

Настоящее изобретение также относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: a) приблизительно 125 до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; b) приблизительно 10 мМ гистидинового буфера; c) приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли; d) приблизительно 7 масс/об сахарозы; и e) приблизительно 0,02% масс/об полисорбата 80.

В некоторых вариантах осуществления композиция антитела к человеческому PD-1 дополнительно включает от приблизительно 1,25% до приблизительно 2,5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления аргинин представляет собой L-аргинин. В других вариантах осуществления аргинин представляет собой L-аргинин HCL.

Настоящее изобретение также относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; b) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; c) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; (ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и (iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли; d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и e) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция антитела к человеческому PD-1 дополнительно включает металлохелатор. В конкретных вариантах осуществления металлохелатор представляет собой DTPA. В некоторых вариантах осуществления DTPA присутствует в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 30 мкМ.

Настоящее изобретение также относится к жидкой композиции антитела к человеческому PD-1, которая восстановлена из лиофилизированной композиции, где восстановленный раствор включает: а) от приблизительно 125 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; б) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; в) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 3% до приблизительно 8% масс/об сахарозы; (ii) от приблизительно 2% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли; (iii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% маннита и от приблизительно 1% до приблизительно 2% сахарозы; и (iv) комбинации i) и ii); и d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб или антигенсвязывающий фрагмент пембролизумаба.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения рака и способам лечения хронической инфекции у пациента-человека, включающим: введение пациенту эффективного количества композиций антител к человеческому PD-1 по настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1А–1С показывают результаты исследования методом НР–НИС, в котором измеряют окисление Met-105, для композиций с высокой концентрацией пембролизумаба в течение 12-недельного периода времени. Результаты представлены для тестируемых композиций (см. Пример 2), хранящихся при 5°C (Фиг. 1А), 25°C (Фиг. 1В) и 40°C (Фиг. 1С).

Фиг. 2А–2С показывают результаты исследования методом НР–НИС композиций в Примере 3. Результаты представлены для тестируемых композиций, хранящихся при 5°C (Фиг. 2А), 25°C (Фиг. 2В) и 40°C (Фиг. 2С) в течение 9 месяцев.

Фиг. 3А–3С показывают результаты анализа НР–SEC (измеренные как % mAb) композиций, описанных в Примере 4. Результаты представлены для композиций, хранящихся при 5°C (Фиг. 3А), 25°C (Фиг. 3В) и 40°C (Фиг. 3С).

Фиг. 4А–4С показывают результаты НР–НИС анализа композиций, описанных в Примере 4. Представленные результаты показывают % пика перед главным пиком 1 +2 (окисленные виды) для композиций, хранящихся при 5°C (Фиг. 3А), 25°C (Фиг. 3В) и 40°C (Фиг. 3С) в течение 12 недель. Пунктирные линии на Фиг. 4В и Фиг. 4С показывают результаты для Композиции 1, Примера 3, в качестве сравнительной композиции.

Фиг. 5 показывает количество агрегации каждой из композиций в Примере 5 за 8-недельный период хранения при 40°C, как измерено при помощи НР–SEC.

Фиг. 6 показывает окисление Met-105 в композициях в Примере 6, Исследовании 2, при 40°C в течение 8-недель, как измерено при помощи НР–НИС.

Фиг. 7 показывает окисление Met-105 в композициях в Примере 6, Исследовании

3, при 40°C в течение 8–недель, как измерено при помощи HP–HIS.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к стабильным композициям, включающим анти–PD–1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим PD–1, которые могут быть использованы для способов лечения рака или иммунного расстройства или иммунного состояния, которые включают внутривенное или подкожное введение пациенту. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения анти–PD–1 антитело представляет собой пембролизумаб или антигенсвязывающий фрагмент пембролизумаба. Композиции по изобретению направлены на решение проблем высокой вязкости и повышенной агрегации, связанных с композициями антител, включающих высокую концентрацию анти–PD–1 антител. Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим пембролизумаб или его антигенсвязывающий фрагмент с пониженным окислением метионина, в том числе с пониженным окислением метионина–105, который расположен в CDR3 тяжелых цепей пембролизумаба.

Композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для подкожной доставки пациенту. Чтобы обеспечить максимальную терапевтическую пользу для пациентов, желательно, чтобы композиции для подкожной (п/к) доставки включали высокую концентрацию антител (75–200 мг/мл). Высокая концентрация API часто требуется для п/к композиций из–за исторической биодоступности 50–60% для п/к инъекций и ожидаемого диапазона доз продукта антитела. Однако высокая концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может способствовать другим свойствам продукта, которые могут быть нежелательными, например, низкая инъекционная способность вследствие повышенной вязкости и выше физиологической осмоляльности и повышенная агрегация. Следовательно, предпочтительно, чтобы продукт антитела, предназначенный для п/к введения, уравнивал эффекты концентрации, поддерживая уровень лекарственного средства, который обеспечит наивысшую терапевтическую пользу. Идеальный продукт включает высокую концентрацию белка, низкую вязкость, осмоляльность, сходную с физиологическими условиями, и низкий уровень агрегации в типичных условиях хранения. Повышенная вязкость при высокой концентрации белка может не только затруднить извлечение продукта из его контейнера с помощью шприца, но и введение необходимой дозы пациенту через шприц (шприцуемость). Предпочтительно варианты осуществления изобретения обеспечивают композиции, которые включают высокую концентрацию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и уровень вязкости, приемлемый для подкожной доставки. Кроме того, композиции по настоящему изобретению не приводят к высоким уровням агрегации, как более подробно показано в Примерах.

Предыдущие исследования с принудительным разложением выполняли на лекарственном веществе (DS) пембролизумабе чтобы исследовать пути разложения продукта и выделить и охарактеризовать примеси. В этих исследованиях DS

пембролизумаб подвергали различным стрессовым состояниям, и анализ образцов, подвергнутых стрессовым воздействиям, показал, что в используемых стрессовых условиях DS пембролизумаб чувствителен к свету, пероксиду и высокому pH. Основные пути разложения пембролизумаба включали окисление метионина 105 (Met105) в CDR тяжелой цепи при пероксид-индуцированном стрессе и окисление Met105 и Fc метиониновых остатков при воздействии света. Пембролизумаб сохранял свою биологическую активность в большинстве стрессовых условий для тестируемых уровней разложения. Однако снижение аффинности к PD-1 наблюдали для образцов в условиях пероксид-индуцированного стресса методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Подвергающийся воздействию метиониновый остаток или метиониновый остаток в CDR антитела обладает потенциалом воздействия на биологическую активность антитела посредством окисления. В настоящей заявке показано, что композиции по настоящему изобретению способны уменьшать окисление Met105 в CDR тяжелой цепи пембролизумаба.

I. Определения и аббревиатуры

В описании и прилагаемой формуле изобретения используются следующие аббревиатуры:

API	активный фармацевтический ингредиент
CDR	область, определяющая комплементарность, в переменных областях иммуноглобулинов
CE-SDS	капиллярный электрофорез-додецилсульфат натрия
CHO	яичник китайского хомячка
CI	доверительный интервал
DS	лекарственное вещество
EC50	концентрация, приводящая к 50% эффективности или связыванию
ELISA	твердофазный иммуноферментный анализ
FFPE	фиксированные формалином, погруженные в парафин
FR	каркасная область
HC	тяжелая цепь
HNSCC	плоскоклеточный рак головы и шеи
HPBC	2-Гидроксипропил)- β -циклодекстрин
HP-HIC	высокоэффективная хроматография гидрофобного взаимодействия
HP-IEC	высокоэффективная ионообменная хроматография
HP-SEC	высокоэффективная эксклюзионная хроматография
IC ₅₀	концентрация, приводящая к 50% ингибированию
IgG	иммуноглобулин G
IHC	иммуногистохимия или иммуногистохимический

mAb	моноклональное антитело
MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
NCBI	Национальный центр биотехнологической информации
NSCLC	немелкоклеточный рак легких
PCR	полимеразная цепная реакция
PD-1	программируемая гибель (клеток) 1 (также известный как рецептор программируемой гибели клеток-1 и рецептор программируемой гибели 1)
PD-L1	лиганд 1 программируемой гибели клеток 1
PD-L2	лиганд 2 программируемой гибели клеток 1
PS80 или PS-80	полисорбат 80
SBEC	(сульфобутилэфир)- β -циклодекстрин
SWFI	стерильная вода для инъекций
TNBC	тройной негативный рак молочной железы
V _H	варибельная область тяжелой цепи иммуноглобулина
V _K	варибельная область легкой каппа-цепи иммуноглобулина
V _L	варибельная область легкой цепи иммуноглобулина
VP-DSC	дифференциальная сканирующая калориметрия Валериана Плотникова
об/об	объем на объем
WFI	вода для инъекций
масс/об	масса на объем

Чтобы изобретение было легче понять, ниже определены конкретные технические и научные термины. Если специально не определено где-либо еще в настоящей заявке, все другие технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение, общеизвестное специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

В описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

Ссылка на "или" указывает одну или обе возможности, если контекст явно не диктует одну из указанных возможностей. В некоторых случаях "и/или" использовали, чтобы особо выделить какую-либо одну или обе возможности.

"Лечить" или "лечение" рака, в рамках изобретения, означает введение композиции по настоящему изобретению пациенту, имеющему иммунное состояние или раковое состояние, или у которого диагностирован рак или патогенная инфекция (например, вирусная, бактериальная, грибковая), для достижения по меньшей мере одного положительного терапевтического эффекта, такого как, например, уменьшение

количества раковых клеток, уменьшение размера опухоли, уменьшение скорости инфильтрации раковых клеток в периферические органы или снижение скорости метастазирования или роста опухоли. "Лечение" может включать одно или несколько из следующего: индукцию/усиление противоопухолевого иммунного ответа, стимуляцию иммунного ответа на патоген, токсин и/или аутоантиген, стимуляцию иммунного ответа на вирусную инфекцию, уменьшение количества одного или нескольких опухолевых маркеров, остановку или задержку роста опухоли или рака крови или прогрессирования заболевания, ассоциированного со связыванием PD-1 с его лигандами PD-L1 и/или PD-L2 ("PD-1-связанного заболевания"), такого как рак, стабилизацию PD-1-связанного заболевания, ингибирование роста или выживания опухолевых клеток, устранение или уменьшение размера одного или нескольких раковых поражений или опухолей, уменьшение уровня одного или нескольких опухолевых маркеров, улучшение, устранение клинических проявлений PD-1-связанного заболевания, уменьшение тяжести или продолжительности клинических симптомов PD-1-связанного заболевания, такого как рак, продление выживаемости пациента относительно ожидаемой выживаемости у аналогичного пациента без лечения, индуцирование полной или частичной ремиссии ракового состояния или другого PD-1-связанного заболевания.

"Иммунное состояние" или "иммунное расстройство" охватывает, например, патологическое воспаление, воспалительное расстройство и аутоиммунное расстройство или заболевание. "Иммунное состояние" также относится к инфекциям, персистирующим инфекциям и пролиферативным состояниям, таким как рак, опухоли и ангиогенез, включая инфекции, опухоли и раковые заболевания, которые резистентны к эрадикации иммунной системой. "Раковое состояние" включает, *например*, рак, раковые клетки, опухоли, ангиогенез и предраковые состояния, такие как дисплазия.

Положительные терапевтические эффекты при раке могут быть измерены несколькими способами (см., W. A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Например, что касается ингибирования роста опухоли, согласно стандартам NCI, T/C $\leq 42\%$ является минимальным уровнем противоопухолевой активности. T/C $< 10\%$ считают высоким уровнем противоопухолевой активности, при этом $T/C (\%) = \frac{\text{Средний объем опухоли при лечении}}{\text{Средний объем опухоли контроля}} \times 100$. В некоторых вариантах осуществления лечение, достигаемое путем введения композиции по настоящему изобретению, представляет собой любое из выживаемости без прогрессирования (PFS), выживаемости без признаков заболевания (DFS) или общей выживаемости (OS). PFS, также называемая "время до прогрессирования опухоли" указывает продолжительность времени, во время и после лечения, в течение которого рак не развивается, и включает количество времени, в течение которого пациенты испытывали полный или частичный ответ, а также количество времени, в течение которого пациенты испытывали стабильное заболевание. DFS относится к промежутку времени во время и после лечения, когда у пациента отсутствует заболевание. OS относится к увеличению продолжительности жизни по сравнению с индивидуумами или пациентами, ранее не получавшими препарат или не проходящими

лечение. Хотя вариант осуществления композиций, способов лечения и применений по настоящему изобретению может быть неэффективным для достижения положительного терапевтического эффекта у каждого пациента, он должен приводить к этому у статистически значимого числа пациентов, что определяется любым статистическим тестом, известным в данной области техники, таким как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса (H-тест), Критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

Термин “пациент” (альтернативно называемый в настоящей заявке “лицом” или “индивидуумом”) относится к млекопитающему (например, крысе, мыши, собаке, кошке, кролику), способному получать лечение композициями по настоящему изобретению, наиболее предпочтительно к человеку. В некоторых вариантах осуществления пациент является взрослым пациентом. В других вариантах осуществления пациент является педиатрическим пациентом. Те из пациентов, которые являются “нуждающимися в лечении”, включают пациентов, которым может быть полезно лечение композициями по настоящему изобретению, например, пациента, страдающего от рака или иммунного состояния.

Термин "антитело" относится к любой форме антитела, которая проявляет желаемую биологическую активность. Таким образом, он используется в самом широком смысле и конкретно охватывает, но не ограничивается этим, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, гуманизированные, полностью человеческие антитела и химерные антитела.

Как правило, основная структурная единица антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50–70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена. Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют сайт связывания антитела. Таким образом, как правило, интактное антитело имеет два сайта связывания. Карбокси-концевая часть тяжелой цепи может определять константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. Обычно человеческие легкие цепи классифицируются как каппа и лямбда легкие цепи. Кроме того, человеческие тяжелые цепи обычно классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA, и IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях вариабельные и константные области соединены "J" областью из примерно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает "D" область из еще примерно 10 аминокислот. См., главным образом, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Как правило, вариабельные домены как тяжелой, так и легкой цепей включают три гипервариабельные области, также называемые областями, определяющими комплементарность (CDRs), которые расположены в относительно консервативных

каркасных областях (FR). CDR обычно выровнены по каркасным областям, что позволяет связываться с конкретным эпитопом. Как правило, от N-конца к С-концу переменные домены как легкой, так и тяжелой цепей включают FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Присвоение аминокислот каждому домену, как правило в соответствии с определениями Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md. ; 5th ed.; NIH Publ. № 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 или антигенсвязывающий фрагмент, который “специфически связывается с” указанным белком-мишенью, представляет собой антитело, которое демонстрирует преимущественное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считают "специфическим" для его целевой мишени, если его связывание является определяющим для присутствия целевого белка в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложные положительные результаты. Антитела или их связывающие фрагменты, полезные в настоящем изобретении, должны связываться с целевым белком со сродством, которое по меньшей мере в два раза больше, предпочтительно по меньшей мере в десять раз больше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз больше и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз больше, чем сродство с нецелевыми белками. В рамках изобретения, считается, что антитело специфически связывается с полипептидом, включающим данную аминокислотную последовательность, например аминокислотную последовательность зрелой молекулы PD-1 человека или PD-L1 человека, если оно связывается с полипептидами, включающими эту последовательность, но не связывается с белками, в которых эта последовательность отсутствует.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителе, происходящем из определенного вида (например, человека) или принадлежащем к определенному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителе, происходящем из другого вида (например, мыши) или принадлежащем к другому классу или подклассу антител, а также к фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

Термин "фармацевтически эффективное количество" или “эффективное количество” означает количество, посредством которого пациенту вводят достаточное количество терапевтической композиции или состава для лечения заболевания или состояния. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что этот уровень может варьировать в зависимости от характеристик пациента, таких как возраст, масса тела и т.д.

Термин "приблизительно", при модификации количества (например, mM, или M)

вещества или композиции, процентного содержания (об/об или масс/об) компонента композиции, pH раствора/композиции или значения параметра, характеризующего стадию в способе, или тому подобного, относится к изменению числового количества, которое может иметь место, например, из-за типичных процедур измерения, обработки и отбора проб, связанных с получением, исследованием и/или использованием вещества или композиции; из-за непреднамеренной ошибки в этих процедурах; из-за различий в изготовлении, источниках или чистоте ингредиентов, используемых для изготовления или использования композиций или выполнения процедур; и т.п. В некоторых вариантах осуществления “приблизительно” может означать вариации $\pm 0,1\%$, $0,5\%$, 1% , 2% , 3% , 4% , 5% или 10% .

Термины "рак", "раковый" или "злокачественный" указывает или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются этим, карциному, лимфому, лейкоз, бластому и саркому. Более конкретные примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, миелому, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, глиому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак желудка–кишечного тракта, рак почки, рак яичников, 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, рак головного мозга, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак печени, рак толстой кишки и рак головы и шеи.

“Химиотерапевтическое средство” представляет собой химическое соединение, полезное в лечении рака. Анти-PD-1 антитела можно использовать с любым одним или несколькими подходящими химиотерапевтическими средствами. Примеры таких химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатаинон); камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; аналоги азотистого иприта, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид мехлоретаминоксида, мелфалан; новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, аналог урацилиприта; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в особенности, калихеамицин гамма

II и калихеамицин фи II, см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183–186 (1994); динемидин, включая динемидин А; бифосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромофоры хромопротеиновых энединовых антибиотиков), алкациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиюгуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; вещество, являющееся источником восполнения фолиевой кислоты, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел и доксетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; препараты платины; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоклутетин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. Также включены антигормональные средства, действие которых заключается в регуляции или ингибировании воздействия гормонов на опухоли, как например, антиэстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен, ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018,

онапристон, и торемифен (Fareston); ингибиторы ароматазы, ингибирующие фермент ароматазу, которая регулирует продуцирование эстрогенов в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, мегестрола ацетат, эксместан, форместан, фадрозол, ворозол, летрозол и анастрозол; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

"Chothia" означает систему нумерации антител, описанную в Al-Lazikani et al., JMB 273:927-948 (1997).

"Kabat" в контексте настоящей заявки означает систему выравнивания и нумерации иммуноглобулинов, впервые разработанную Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.).

"Средство, ингибирующее рост" в контексте настоящей заявки относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки, особенно раковой клетки, сверхэкспрессирующей любой из генов, идентифицированных в настоящей заявке, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, средство, ингибирующее рост является средством, которое значительно снижает процент клеток, сверхэкспрессирующих такие гены в S фазе. Примеры средства, ингибирующего рост, включают средства, которые блокируют прогрессирование клеточного цикла (в месте, отличном от S-фазы), такие как средства, которые вызывают остановку G1 и остановку M-фазы. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топо II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин и этопозид. Те агенты, которые останавливают G1, также распространяются на остановку S-фазы, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как дакарбазин, мехлорэтамин и цисплатин. Дополнительную информацию можно найти 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 "PD-1 связывающий фрагмент," "его антигенсвязывающий фрагмент," "его связывающий фрагмент" или "его фрагмент" охватывают фрагмент или производное антитела, который еще по существу сохраняет биологическую активность связывания с антигеном (PD-1 человека) и ингибирование его активности (например, блокирование связывания PD-1 с PDL1 и PDL2). Следовательно, термин "фрагмент антитела" или PD-1 связывающий фрагмент относятся к части полноразмерного антитела, обычно к его антигенсвязывающей или вариабельной области. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты. Как правило, связывающий фрагмент или производное сохраняет по меньшей мере 10% активности, ингибирующей 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) ингибирующей активности в отношении PD-1, хотя любой связывающий фрагмент с достаточной аффинностью для проявления желаемого биологического эффекта будет полезным. В

некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывается со своим антигеном со сродством, которое по меньшей мере в два раза больше, предпочтительно по меньшей мере в десять раз больше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз больше, чем сродство с неродственными антигенами. В одном варианте осуществления антитело имеет сродство, которое больше чем приблизительно 10^9 литров/моль, как определено, например, анализом Скэтчарда. Munsen et al. (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220–239. Предполагают также, что PD-1-связывающий фрагмент может включать варианты, имеющие консервативные аминокислотные замены, которые существенно не изменяют его биологическую активность.

"Гуманизированное антитело" относится к формам антител, которые содержат последовательности из не-человеческих антител (например, мышиных), а также человеческих антител. Такие антитела содержат минимальную последовательность, происходящую из не-человеческого иммуноглобулина. Как правило, гуманизированное антитело будет включать, по существу все из по меньшей мере одного, и типично двух переменных доменов, в которых все, или по существу все, гиперпеременные петли соответствуют петлям не-человеческого иммуноглобулина, и все или, по существу все, FR области представляют собой области человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также будет включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), типично человеческого иммуноглобулина. Гуманизированные формы антител грызунов обычно содержат одинаковые последовательности CDR родительских антител грызунов, хотя некоторые аминокислотные замены могут быть включены для повышения аффинности, повышения стабильности гуманизированного антитела или по другим причинам.

Антитела по настоящему изобретению также включают антитела с модифицированными (или блокированными) областями Fc для обеспечения измененных эффекторных функций. См., например, патент США № 5624821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640–656. Такая модификация может использоваться для усиления или подавления различных реакций иммунной системы с возможными полезными эффектами при диагностике и терапии. Изменения в Fc области включают аминокислотные замены (замены, делеции и вставки), гликозилирование или дегликозилирование и добавление нескольких Fc. Изменения в Fc также могут изменять период полужизни антител в терапевтических антителах, и более длительный период полужизни может привести к менее частому дозированию с сопутствующим повышенным удобством и уменьшением использования материала. См., Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734–35.

"Полностью человеческое антитело" относится к антителу, которое содержит только последовательности белка человеческого иммуноглобулина. Полностью человеческое антитело может содержать мышиные углеводные цепи, если оно продуцируется у мыши, в клетке мыши или в гибридоме, полученной из клетки мыши.

Подобным образом, “мышинное антитело” относится к антителу, которое содержит только последовательности мышинного иммуноглобулина. Полностью человеческое антитело может быть вырабатываться в организме человека, трансгенного животного, имеющего последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, методом фагового дисплея или других молекулярно–биологических методов.

"Гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область включает аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность" или "CDR" (*например*, остатки 24–34 (CDRL1), 50–56 (CDRL2) и 89–97 (CDRL3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки 31–35 (CDRH1), 50–65 (CDRH2) и 95–102 (CDRH3) в вариабельном домене тяжелой цепи, как определено с использованием 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 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 контексте настоящей заявки термин "каркасные" или "FR" остатки относится к тем остаткам вариабельного домена, которые не являются остатками гипервариабельной области, определенными в настоящей заявке как остатки CDR. Остатки CDR и FR определяют в соответствии со стандартным определением последовательности Kabat. Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md.

“Консервативно модифицированные варианты” или “консервативная замена” относится к заменам аминокислот, известным специалистам в данной области техники, и они могут быть сделаны, как правило, без изменения биологической активности полученной молекулы, даже в основных областях полипептида. Такие типичные замены предпочтительно выполняют в соответствии с изложенными в Таблице 1 следующим образом:

Таблица 1

Типичные 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, специалистам в данной области должно быть понятно, что, как правило, единичные аминокислотные замены в не-существенных 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 “состоит по существу из” или варианты, такие как “состоят по существу из” или “состоящий по существу из” используемые повсеместно в описании и формуле изобретения, указывают на включение любых перечисленных элементов или групп элементов и необязательное включение других элементов, аналогичных или отличающихся от перечисленных элементов, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного режима дозирования, способа или композиции. В качестве неограничивающего примера, связывающее соединение, которое состоит по существу из указанной аминокислотной последовательности, может также включать одну или несколько аминокислот, включая замены одного или нескольких аминокислотных остатков, которые не оказывают существенного влияния на свойства связывающего соединения.

"Включающий" или варианты, такие как "включают", "включает" или "состоит из", используются в описании и формуле изобретения в смысле "включающий", то есть, для указания наличия заявленных признаков, но не исключения присутствия или добавления дополнительных признаков, которые могут существенно улучшить работу или полезность любого из вариантов осуществления изобретения, если контекст не требует иного из-за явного указания или необходимого значения.

"Выделенное антитело" и “выделенный фрагмент антитела” относится к статусу очистки, и в таком контексте означает, что указанная молекула по существу не содержит других биологических молекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другой материал, такой как клеточный дебрис и среда для роста. Как правило, термин "выделенный" не предназначен для обозначения полного отсутствия такого материала или отсутствия воды, буферов или солей, если они не присутствуют в количествах, которые по существу мешают экспериментальному или терапевтическому применению связывающего соединения, как описано в настоящей заявке.

"Моноклональное антитело" или “mAb” или “Mab” в контексте настоящей заявки относится к популяции по существу гомогенных антител, то есть молекулы антител, составляющие эту популяцию, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут

присутствовать в незначительных количествах. Напротив, препараты обычных (поликлональных) антител обычно включают множество различных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в своих вариабельных доменах, особенно их CDR, которые часто специфичны для разных эпитопов. Модификатор "моноклональный" указывает на характер антитела, получаемого из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с изобретением, могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al. (1975) Nature 256: 495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональное антитело" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методик, 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" в том смысле, как это применимо к пациенту, у которого диагностирован или предположительно имеется рак, относится к злокачественному или потенциально злокачественному новообразованию или массе ткани любого размера и включает первичные опухоли и вторичные новообразования. Солидная опухоль представляет собой аномальный рост или массу ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их формируют. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (рак крови) обычно не образуют солидных опухолей ((National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

Термин "размер опухоли" относится к общему размеру опухоли, который может быть измерен как длина, так и ширина опухоли. Размер опухоли может быть определен различными способами, известными в данной области, такими как, например, путем измерения размеров опухоли (опухолей) при удалении у пациента, например, при помощи штангенциркуля, или при нахождении в теле, используя методы визуализации, например, сканирование кости, ультразвук, компьютерную томографию или МРТ.

"Вариабельные области" или "V-область" в контексте настоящей заявки означает сегмент цепей IgG, который является вариабельным по последовательности между различными антителами. Он простирается до остатка 109, по Kabat, в легкой цепи и 113 в тяжелой цепи.

Термин "буфер" охватывает те агенты, которые поддерживают pH раствора композиций по настоящему изобретению в приемлемом диапазоне или, для лиофилизированных композиций изобретения, обеспечивают приемлемый pH раствора до лиофилизации.

Термины "лиофилизация", "лиофилизированный" и "сублимированный" относятся к процессу, посредством которого подлежащий сушке материал сначала замораживают, а затем лед или замороженный растворитель удаляют сублимацией в вакуумной среде.

Экспципиент может быть включен в предварительно лиофилизированные композиции для повышения стабильности лиофилизированного продукта при хранении.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препаратам, которые находятся в такой форме, которая позволяет активным ингредиентам быть эффективными, и которые не содержат дополнительных компонентов, которые являются токсичными для пациентов, которым препарат будет введен. Термины "композиция" и "фармацевтическая композиция" используют взаимозаменяемо по всему тексту заявки.

"Фармацевтически приемлемый" относится к экспципиентам (носителям, добавкам) и композициям, которые могут быть разумно введены пациенту для обеспечения эффективной дозы используемого активного ингредиента и которые "обычно считаются безопасными", например, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают аллергическую или подобную неблагоприятную реакцию, такую как расстройство желудка и тому подобное, при введении человеку. В другом варианте осуществления этот термин относится к химическим соединениям и композициям, утвержденным регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленным в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения для животных и, в частности, для человека.

"Восстановленная" композиция представляет собой композицию, которая была получена путем растворения лиофилизированной белковой композиции в разбавителе так, чтобы белок был диспергированным в восстановленной композиции. Восстановленная композиция является подходящей для введения, *например*, парентерального введения), и необязательно может быть подходящей для подкожного введения.

"Время восстановления" представляет собой время, необходимое для регидратации лиофилизированной композиции раствором до получения не содержащего частиц очищенного раствора.

"Стабильная" композиция представляет собой композицию, в которой белок в ней по существу сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность при хранении. Различные аналитические методы для измерения стабильности белка доступны в данной области и описаны в Peptide and Protein Drug Delivery, 247–301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29–90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени.

"Стабильная" композиция представляет собой композицию, в которой белок в ней по существу сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность при хранении. Различные аналитические методы для измерения стабильности белка доступны в данной области и описаны в Peptide and Protein Drug Delivery, 247–301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29–90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Например, в одном варианте осуществления, стабильная композиция представляет собой композицию без

существенных изменений, наблюдаемых при температуре охлаждения ($2-8^{\circ}\text{C}$) в течение по меньшей мере 12 месяцев. В другом варианте осуществления стабильная композиция представляет собой композицию без существенных изменений, наблюдаемых при температуре охлаждения ($2-8^{\circ}\text{C}$) в течение по меньшей мере 18 месяцев. В другом варианте осуществления стабильная композиция представляет собой композицию без существенных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре ($23-27^{\circ}\text{C}$) в течение по меньшей мере 3 месяцев. В другом варианте осуществления стабильная композиция представляет собой композицию без существенных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре ($23-27^{\circ}\text{C}$) в течение по меньшей мере 6 месяцев. В другом варианте осуществления стабильная композиция представляет собой композицию без существенных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре ($23-27^{\circ}\text{C}$) в течение по меньшей мере 12 месяцев. В другом варианте осуществления стабильная композиция представляет собой композицию без существенных изменений, наблюдаемых при комнатной температуре ($23-27^{\circ}\text{C}$) в течение по меньшей мере 18 месяцев. Критерии стабильности для композиции антител следующие. Как правило, не более 10%, предпочтительно 5% мономера антитела разлагается, как измерено при помощи SEC-ВЭЖХ. Как правило, композиция является бесцветной или прозрачной или слегка опалесцентной при визуальном анализе. Как правило, концентрация, pH и осмоляльность композиции имеют изменение не более $\pm 10\%$. Эффективность обычно находится в пределах 60–140%, предпочтительно 80–120% от контроля или эталона. Обычно наблюдают не более 10%, предпочтительно 5% сокращения антитела, то есть % низкомолекулярных частиц, как определено, например, при помощи HP-SEC. Как правило, наблюдают не более 10%, предпочтительно не более 5% агрегации антитела, то есть % высокомолекулярных частиц, как определено, например, при помощи HP-SEC.

Антитело "сохраняет свою физическую стабильность" в фармацевтической композиции, если оно не показывает значительного увеличения агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальном исследовании цвета и/или прозрачности, или при измерении методом рассеяния УФ-света, эксклюзионной хроматографии (SEC) и динамического рассеяния света. Изменения конформации белка можно оценить при помощи флуоресцентной спектроскопии, которая определяет третичную структуру белка, и при помощи FTIR-спектроскопии, которая определяет вторичную структуру белка.

Антитело "сохраняет свою химическую стабильность" в фармацевтической композиции, если оно не демонстрирует значительных химических изменений. Химическая стабильность может быть оценена путем обнаружения и количественного определения химически измененных форм белка. Процессы распада, которые часто изменяют химическую структуру белка, включают гидролиз или сокращение (оценивается такими методами, как эксклюзионная хроматография и SDS-PAGE), окисление (оценивается такими методами, как пептидное картирование в сочетании с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS), деамидирование (оценивается такими методами, как ионообменная хроматография, капиллярное изoeлектрическое фокусирование,

пептидное картирование, измерение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризацию (оценивается путем измерения содержания изоаспарагиновой кислоты, пептидного картирования и т.д.).

Антитело "сохраняет свою биологическая активность" в фармацевтической композиции, если биологическая активность антитела в данный момент времени находится в пределах заранее определенного диапазона биологической активности, продемонстрированной, когда была получена фармацевтическая композиция. Биологическую активность антитела можно определить, например, с использованием анализа связывания антигена. Композиции по изобретению включают антитела и их фрагменты, которые являются биологически активными при восстановлении или в жидкой форме.

Термин "изотонический" означает, что представляющая интерес композиция имеет по существу такое же осмотическое давление, что и кровь человека. Изотонические составы обычно имеют осмотическое давление от 270 до 328 мОсм. Слегка гипотоническое давление составляет 250–269, а слегка гипертоническое давление составляет 328–350 мОсм. Осмотическое давление можно измерить, например, при помощи парового осмометра или осмометра по точке замерзания.

“Невосстанавливающий сахар” представляет собой сахар, не способный действовать в качестве восстановителя, поскольку он не содержит или не может быть преобразован в свободную альдегидную группу или свободную кетонную группу. Примеры невосстанавливающих сахаров включают, но не ограничиваются этим, дисахариды, такие как сахароза и трегалоза.

“Пембролизумаб” (ранее известный как MK-3475, SCH 900475 и ламбролизумаб), альтернативно называемый в настоящей заявке “пембро”, представляет собой гуманизированное mAb IgG4 со структурой, описанной в WHO Drug Information, Vol. 27, № 2, pages 161–162 (2013) и которая включает аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи и CDR, описанные в Таблице 2. Пембролизумаб был одобрен FDA (управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов) США для лечения пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой и для лечения некоторых пациентов с рецидивирующим или метастатическим плоскоклеточным раком головы и шеи (HNSCC), классической лимфомой Ходжкина (cHL), уротелиальным раком, раком желудка, раком с высокочастотной микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и немелкоклеточным раком легких, как описано в Prescribing Information for KEYTRUDA™ (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ USA; initial U.S. approval 2014, updated September 2017).

II. Композиции по настоящему изобретению

Композиции по настоящему изобретению минимизируют образование агрегатов и макрочастиц антител, высокомолекулярных и низкомолекулярных частиц, минимизируют окисление метиониновых остатков и, в частности, Met105 пембролизумаба, и гарантируют, что антитело сохраняет биологическую активность с течением времени.

Настоящее изобретение включает различные композиции антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано более подробно, ниже. Например, настоящее изобретение включает композиции, включающие (i) анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, (ii) буфер (например, гистидин или ацетат), (iii) стабилизатор (например, невосстанавливающий сахар, такой как сахароза или трегалоза или сорбитол, маннит, (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин, аргинин, пролин или глицин); (iv) неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80); и (v) антиоксидант (например, метионин). В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают агент для уменьшения вязкости (например, аргинин или его фармацевтически приемлемую соль) и/или металлохелатор (например, DTPA).

Анти-PD-1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

Настоящее изобретение обеспечивает стабильные биологические композиции, включающие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим PD-1 (например, человеческое антитело или гуманизированное анти-PD-1 антитело) в качестве активного фармацевтического ингредиента (API), а также способы для использования композиций по настоящему изобретению. Любое анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать в композициях и способах по настоящему изобретению. В конкретных вариантах осуществления API представляет собой анти-PD-1 антитело, которое выбрано 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 типичных антител к человеческому PD-1 – пембролизумаба и ниволумаба. Альтернативные PD-1 антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые полезны в композициях и способах по настоящему изобретению, показаны в Таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающему фрагменту для использования в композициях по настоящему изобретению включает три CDR легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3 и/или три CDR тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3.

В одном варианте осуществления настоящего 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, а три CDR тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8.

В альтернативном варианте осуществления настоящего 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, а 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, а три CDR тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:18.

В следующем варианте осуществления настоящего 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.

Еще в одном 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, а три CDR тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26.

Некоторые антитела и антигенсвязывающие фрагменты композиций по настоящему изобретению включают переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO:4 или вариант SEQ ID NO:4, и переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO:9 или вариант SEQ ID NO:9. В других вариантах осуществления переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO:14 или вариант SEQ ID NO:14, и переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO:19 или вариант SEQ ID NO:19. В других вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO:27 или вариант SEQ ID NO:27 и переменная область легкой цепи включает 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 идентичен референсной последовательности, за исключением того, что имеет одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления замены находятся в каркасной области (то есть вне CDR). В некоторых вариантах осуществления одна, две, три, четыре или пять аминокислотных замен являются консервативными заменами.

В одном варианте осуществления композиций по настоящему изобретению антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:4, и переменную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:9. В дополнительном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:14, и переменную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:19. В одном варианте осуществления композиций по настоящему изобретению антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:28, и переменную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:27. Еще в одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:29, и переменную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:27. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:30, и переменную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из SEQ ID NO:27.

В другом варианте осуществления композиции по настоящему изобретению включают антитело или антигенсвязывающий белок, который имеет домен V_L домен и/или V_H домен с гомологией последовательности по меньшей мере 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или 50% с одним из V_L доменов или V_H доменов, описанных выше, и демонстрирует специфическое связывание с PD-1. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий белок композиций по настоящему изобретению включает V_L и V_H домены, имеющие до 1, 2, 3, 4 или 5 или более аминокислотных замен, и демонстрирует специфическое связывание с PD-1.

В любом из приведенных выше вариантов осуществления API может представлять собой полноразмерное анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим PD-1. В некоторых вариантах осуществления API представляет собой полноразмерное анти-PD-1 антитело, выбранное из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE. Предпочтительно, антитело представляет собой IgG антитело. Можно использовать любой изотип IgG, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Различные константные домены могут быть присоединены к областям V_L и V_H , представленным в настоящей заявке. Например, если конкретное предполагаемое использование антитела (или фрагмента) по изобретению должно вызывать измененные эффекторные функции, можно использовать константный домен тяжелой цепи, отличный от IgG1. Хотя IgG1 антитела обеспечивают длительный период полужизни и эффекторные функции, такие как активация комплемента и антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, такая активность может быть нежелательной для всех применений антитела. В таких случаях, например, можно использовать константный домен IgG4.

В вариантах осуществления настоящего изобретения API представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:5, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:10. В альтернативных вариантах осуществления API представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:15, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:20. В других вариантах осуществления API представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:32, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:31. В дополнительных вариантах осуществления API представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:33, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:31. В других дополнительных вариантах осуществления API представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее легкую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:34, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислотных остатков, представленной в SEQ ID NO:31. В некоторых композициях по настоящему изобретению API представляет собой пембролизумаб или биоаналог пембролизумаба. В некоторых композициях по настоящему изобретению API представляет собой ниволумаб или биоаналог ниволумаба.

Обычно варианты аминокислотных последовательностей анти-PD-1 антител и антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению будут иметь аминокислотные последовательности, имеющие идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 75% с аминокислотной последовательностью эталонного антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, тяжелая цепь, легкая цепь, V_H , V_L , или гуманизированная последовательность), 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 гомология в отношении последовательности определяется в настоящей заявке как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны анти-PD-1 остаткам, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и не рассматривая какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательности. Ни одно из N-концевых, C-концевых или внутренних удлинений, делеций или вставок в

последовательности антитела не должно рассматриваться как влияющее на идентичность или гомологию последовательности.

Идентичность последовательности относится к степени, в которой аминокислоты двух полипептидов являются одинаковыми в эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены. Идентичность последовательности может быть определена с использованием алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны так, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих сравниваемых последовательностей. Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, часто используемым для анализа последовательности: 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 Способы in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1–14, Plenum, New York.

Аналогично, любой класс легкой цепи можно использовать в композициях и способах по настоящему изобретению. В частности, каппа, лямбда или их варианты полезны в композициях и способах по настоящему изобретению.

Таблица 2

Иллюстративные последовательности антител к PD-1

Характерная особенность антитела	Аминокислотные последовательности	SEQ ID №
Легкая цепь пембролизумаба		
CDR1	RASKGVSTSGYSYLH	1
CDR2	LASYLES	2
CDR3	QHSRDLPLT	3
Вариабельная область	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLH WYQQKPGQAPRLIYLA SYLESGV PARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG TKVEIK	4

Легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLH WYQQKPGQAPRLLIYLAASYLESGVPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	5
Тяжелая цепь пембролизумаба		
CDR1	NYMY	6
CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN	7
CDR3	RDYRFDMGFDY	8
Вариабельная область	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYMY WVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTTVTVSS	9
Тяжелая цепь	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYMY WVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVD KRVEKYGPPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFQFLYSRLLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	10
Легкая цепь ниволумаба		
CDR1	RASQSVSSYLA	11
CDR2	DASNRAT	12
CDR3	QQSSNWPRT	13
Вариабельная область	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTVEIK	14
Легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	15
Тяжелая цепь ниволумаба		
CDR1	NSGMH	16
CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKG	17
CDR3	NDDY	18
Вариабельная область	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLFLQMNSLRADDTAVYYCATNDDYWGQG TLVTVSS	19

Тяжелая цепь	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGGQ TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK	20
--------------	---	----

Таблица 3

Дополнительные антитела к PD-1 и антигенсвязывающие фрагменты, полезные в композициях, способах и применениях по настоящему изобретению

А. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, включающие 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, включающие переменную область тяжелой цепи зрелого h109A и одну из переменных 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, включающие 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 композиций по настоящему изобретению, API (т.е. анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) присутствует в концентрации от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления API присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению API (т.е. анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В альтернативных вариантах осуществления API присутствует в концентрации приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 125 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 165 мг/мл, приблизительно 167 мг/мл, приблизительно 175 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл.

В одном варианте осуществления API присутствует в концентрации от

приблизительно 165 до приблизительно 170 мг/мл.

В одном варианте осуществления API присутствует в концентрации приблизительно 167 мг/мл.

В одном варианте осуществления API присутствует в концентрации приблизительно 130 мг/мл.

В дополнительных вариантах осуществления API присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл; от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл; от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл; от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл; от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл; от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл; от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл; от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл; от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл; от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл; от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл; от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл; от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл; от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл; от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 125 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл, от приблизительно 125 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл или от приблизительно 5 мг/мл до 200 мг/мл.

Экципиенты для получения композиций

Композиции по настоящему изобретению включают по меньшей мере один эксципиент, который стабилизирует композицию. В некоторых вариантах осуществления композиция включает более одного стабилизатора.

В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению стабилизатором является невосстанавливающий сахар. В вариантах осуществления настоящего изобретения невосстанавливающий сахар представляет собой глюкозу. В других вариантах осуществления невосстанавливающий сахар представляет собой сахарозу. В дополнительных вариантах осуществления невосстанавливающий сахар представляет собой трегалозу. В других дополнительных вариантах осуществления невосстанавливающий сахар представляет собой лактозу. В других вариантах осуществления невосстанавливающий сахар представляет собой рафинозу.

В некоторых вариантах осуществления композиции антител к человеческому PD-1 по настоящему изобретению включают стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: от приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L-аргинина или фармацевтически приемлемой соли L-аргинина, или L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно

6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об трегалозы.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой сахарозу, трегалозу или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин, который присутствует в количестве от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об. В других вариантах осуществления сахароза, трегалоза или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин присутствует в количестве от приблизительно 6,5% до приблизительно 7,5% масс/об. В других дополнительных вариантах осуществления сахароза, трегалоза или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин присутствует в количестве от приблизительно 6% масс/об, приблизительно 6,25% масс/об, приблизительно 6,5% масс/об, приблизительно 6,75% масс/об, приблизительно 7% масс/об, приблизительно 7,25% масс/об, приблизительно 7,5% масс/об, приблизительно 7,75% масс/об или приблизительно 8% масс/об.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об сорбитола.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению включает аргинин, например, L-аргинин или его фармацевтически приемлемую соль. В дополнительных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают аргинин гидрохлорид (т.е. аргинин HCl). В других вариантах осуществления композиции включают аргинин сукцинат. В других вариантах осуществления аргинин представляет собой L-аргинин.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об пролина, например L-пролин или его фармацевтически приемлемой соли. В дополнительных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают пролин гидрохлорид (т.е. пролин HCl). В других вариантах осуществления композиции включают L-пролин.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой маннит, сорбит, L-аргинин, фармацевтически приемлемую соль L-аргинина, L-пролин или фармацевтически приемлемую соль L-пролина, который присутствует в количестве от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об. В других вариантах осуществления маннит, сорбит, L-аргинин, фармацевтически приемлемая соль L-аргинина, L-пролин или фармацевтически приемлемая соль L-пролина присутствует в количестве от приблизительно 3,5% до приблизительно 4,5% масс/об. В других дополнительных

вариантах осуществления маннит, сорбит, L–аргинин, фармацевтически приемлемая соль L–аргинина, L–пролин или фармацевтически приемлемая соль L–пролина присутствует в количестве приблизительно 3% масс/об, приблизительно 3,25% масс/об, приблизительно 3,5% масс/об, приблизительно 3,75% масс/об, приблизительно 4% масс/об, приблизительно 4,25% масс/об, приблизительно 4,5% масс/об, приблизительно 4,75% масс/об или приблизительно 5% масс/об.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор включает от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению включает глицин или его фармацевтически приемлемую соль. В дополнительных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают глицинат натрия.

В конкретных вариантах осуществления стабилизатор представляет собой глицин, который присутствует в количестве от приблизительно 150 мМ до приблизительно 200 мМ, или приблизительно 150 мМ, приблизительно 160 мМ, приблизительно 170 мМ, приблизительно 175 мМ, приблизительно 180 мМ, приблизительно 190 мМ или приблизительно 200 мМ.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой глицин, который присутствует в количестве от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об, от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,5%, или от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,5%, или от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,2%. В конкретных вариантах осуществления глицин присутствует в количестве приблизительно 1,8%, приблизительно 2,0% приблизительно 2,2% или приблизительно 2,5%.

В некоторых вариантах осуществления композиции антител к человеческому PD–1 по настоящему изобретению включают стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из (1) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы, трегалозы или (2–гидроксипропил)– β –циклодекстрина; (2) от приблизительно 3% до приблизительно 5% маннита, сорбита, L–пролина или фармацевтически приемлемой соли L–пролина; и (3) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли.

Композиции по настоящему изобретению необязательно включают аргинин, например L–аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, который может обеспечить дополнительную стабильность для композиции, а также контролировать вязкость, что позволяет получить композицию с высокой концентрацией API. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения L–аргинин или фармацевтически приемлемая соль присутствует в композициях в количестве от 0,25% до приблизительно 3% масса/объем. В дополнительных вариантах осуществления L–аргинин или фармацевтически приемлемая соль присутствует в количестве приблизительно 0,25% масс/об, приблизительно 0,50% масс/об, приблизительно 0,75% масс/об, приблизительно 1,0% масс/об, приблизительно 1,25% масс/об, приблизительно 1,5% масс/об,

приблизительно 1,75% масс/об, приблизительно 2,0% масс/об, приблизительно 2,25% масс/об, приблизительно 2,5% масс/об, приблизительно 2,75% масс/об или приблизительно 3,0% масс/об. В других вариантах осуществления L-аргинин или фармацевтически приемлемая соль присутствует в количестве от приблизительно 0 до приблизительно 2,75% масс/об, от 0 до приблизительно 2,5% масс/об, от 0 до приблизительно 2,25% масс/об, от 0 до приблизительно 2% масс/об, от 0 до приблизительно 1,75% масс/об, от 0 до приблизительно 1,5% масс/об, от 0 до приблизительно 1,25% масс/об, от 0 до приблизительно 1,0% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 3,0% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 2,75% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 2,5% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 2,25% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 2% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,75% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,5% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,25% масс/об, от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,0% масс/об, от приблизительно 1,0% до приблизительно 3,0% масс/об, от приблизительно 1,0% до приблизительно 2,75% масс/об, от приблизительно 1,0% до приблизительно 2,5% масс/об, от приблизительно 1,0% до приблизительно 2,25% масс/об, от приблизительно 1,0% до приблизительно 2% масс/об, от приблизительно 1,0% до приблизительно 1,75% масс/об, от приблизительно 1,0% до приблизительно 1,5% масс/об, от приблизительно 1,5% до приблизительно 3,0% масс/об, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,75% масс/об, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,5% масс/об, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,25% масс/об, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2% масс/об или приблизительно 2% до приблизительно 3% масс/об.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизатор выбран из группы, состоящей из: от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита или пролина или его фармацевтически приемлемой соли; и от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли, и композиция дополнительно включает L-аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, который можно добавлять в любом из указанных выше количеств для снижения вязкости композиции, особенно когда API присутствует в высокой концентрации (например, 75 мг/мл–200 мг/мл). Понятно, что хотя L-аргинин или его фармацевтически приемлемая соль могут быть добавлены для снижения вязкости в таких вариантах осуществления, L-аргинин или фармацевтически приемлемая соль также может служить для стабилизации композиции и может придавать дополнительную стабильность относительно композиции без L-аргинина или фармацевтически приемлемой соли.

Как отмечено выше, в конкретных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают высокую концентрацию API (например, от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл). В конкретных вариантах

осуществления, где использована высокая концентрация API, композиции по изобретению также содержат аргинин, например L-аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, например, количество L-аргинина от приблизительно 0,25% до приблизительно 3,0% масс/об.

В дополнение к анти-PD-1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту и стабилизатору в количествах/концентрациях, указанных выше, композиции по настоящему изобретению также включают буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в количестве от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ, которое обеспечивает pH в диапазоне приблизительно 4,5–6,4.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буфер обеспечивает pH композиции в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5. В других вариантах осуществления буфер имеет pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0. В других дополнительных вариантах осуществления pH находится на уровне от приблизительно 5,3 до приблизительно 5,8. В других вариантах pH находится на уровне от приблизительно 6,0 до приблизительно 6,4.

В конкретных вариантах осуществления буфер имеет pH приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4, приблизительно 5,5, приблизительно 5,6, приблизительно 5,7, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,2 или приблизительно 6,4. Примеры буферов, которые будут контролировать уровень pH в этом диапазоне, включают сукцинат (натрия или калия), гистидин, ацетат натрия, фосфат (натрия или калия), Tris (трис(гидроксиметил)аминометан), диэтаноламин, цитрат (натрия) и другие органические кислотные буферы.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения буфер представляет собой гистидин или ацетат при pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой L-гистидиновый буфер. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления буфер представляет собой ацетат. В вариантах осуществления, где композиция является лиофилизированной, предпочтительно, чтобы буфер не был ацетатным, поскольку ацетатные буферные системы не совместимы с процессом лиофилизации.

Когда указан диапазон значений pH, например “pH от 5,5 до 6,0,” этот диапазон должен включать указанные значения. Если не указано иное, для лиофилизированной формулы pH относится к pH после восстановления лиофилизированных композиций по настоящему изобретению. Уровень pH обычно измеряют при 25°C с использованием стандартного pH-метра со стеклянной колбой. В контексте настоящей заявки раствор, содержащий “гистидиновый буфер при pH X” относится к раствору при pH X и включающему гистидиновый буфер, *т.е.* предполагается, что pH относится к pH раствора.

В дополнение к анти-PD-1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, стабилизатору и буферу в количествах/концентрациях, указанных выше, композиции по настоящему изобретению также включают антиоксидант. В вариантах осуществления

настоящего изобретения антиоксидант представляет собой метионин. В вариантах осуществления настоящего изобретения антиоксидант представляет собой L-метионин или его фармацевтически приемлемую соль. В других вариантах осуществления метионин представляет собой L-метионин. В других вариантах осуществления антиоксидант представляет собой L-метионин HCl. В других вариантах осуществления антиоксидант представляет собой гистидин.

В некоторых вариантах осуществления антиоксидант (например, L-метионин) присутствует в композициях по настоящему изобретению в количестве от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ. В других вариантах осуществления антиоксидант присутствует в количестве от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ. В дополнительных вариантах осуществления антиоксидант присутствует в количестве приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ, приблизительно 5 мМ, приблизительно 6 мМ, приблизительно 7 мМ, приблизительно 8 мМ, приблизительно 9 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 11 мМ, приблизительно 12 мМ, приблизительно 13 мМ, приблизительно 14 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 16 мМ, приблизительно 17 мМ, приблизительно 18 мМ, приблизительно 19 мМ или приблизительно 20 мМ.

В вариантах осуществления, где антиоксидант представляет собой гистидин, гистидин может присутствовать в количествах до 100 мМ. В таких вариантах осуществления гистидин может действовать в качестве буфера и в качестве антиоксиданта в композициях по настоящему изобретению.

В дополнение к анти-PD-1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, стабилизатору и буферу в количествах/концентрациях, указанных выше, композиции по настоящему изобретению также включают поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества обычно добавляют в композиции для обеспечения стабильности, уменьшения и/или предотвращения агрегации или для предотвращения и/или ингибирования повреждения белка в условиях обработки, таких как очистка, фильтрация, лиофилизация, транспортировка, хранение и доставка. В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-активное вещество полезно для обеспечения дополнительной стабильности активного ингредиента(ов), т.е. анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Поверхностно-активные вещества, которые могут быть использованы в композициях по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим: неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтиленовые сложные эфиры сорбитана и жирных кислот (полисорбаты, продающиеся под торговым наименованием Tween® (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE), включая Полисорбат-20 (полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат), Полисорбат-40 (полиоксиэтиленсорбитанмонопальмитат), Полисорбат-60 (полиоксиэтиленсорбитанмоностеарат) и Полисорбат-80

(полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат); полиоксиэтиленалкиловые эфиры, такие как Brij® 58 (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE) и Brij® 35; полуксамеры (например, полуксамер 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®, такие как плуроник® F68, плуроник® 10R5, плуроник® F108, плуроник® F127, плуроник® F38, плуроник® L44, плуроник® L62 (BASF Corp., Ludwigshafen, Germany); и додецилсульфат натрия (SDS).

Количество поверхностно-активного вещества, которое должно быть включено в композиции по настоящему изобретению, представляет собой количество, достаточное для осуществления желаемой функции, то есть минимальное количество, необходимое для стабилизации активного фармацевтического ингредиента (т.е. анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) в композиции. Как правило, поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от приблизительно 0,008% до приблизительно 0,1% масс/об% масс/об. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта по настоящему изобретению, поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в количестве 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 настоящего изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей: Полисорбат 20, Полисорбат 80 и F127. В предпочтительных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой Полисорбат 80.

В конкретных вариантах осуществления PD-1 композиции по настоящему изобретению включают от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% PS80. В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают PS80 в количестве приблизительно 0,008%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,015%, приблизительно 0,02%, приблизительно 0,025%, приблизительно 0,03%, приблизительно 0,035%, приблизительно 0,04% или приблизительно 0,045%. В конкретных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению включают приблизительно 0,02% PS80.

Настоящее изобретение также относится к композиции антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где композиция содержится в стеклянном флаконе или инъекционном устройстве (например, шприце).

В вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению композиция антитела к человеческому PD-1 имеет одну или несколько из следующих характеристик после хранения при 2–8°C в течение 12 месяцев:

а) % тяжелой цепи и легкой цепи, как измерено методом CE-SDS в восстанавливающих условиях, составляет $\geq 90,0\%$,

б) % интактного IgG, как измерено методом CE-SDS в невосстанавливающих условиях, составляет $\geq 90,0\%$, и

с) % мономера, как измерено методом HP-SEC, составляет $>95\%$.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям антител к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 2–8°C в течение 12 месяцев, % тяжелой цепи и легкой цепи, измеренный методом CE-SDS в восстанавливающих условиях, составляет $> 96\%$.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 2–8°C в течение 12 месяцев % интактного IgG, измеренный методом CE-SDS в невосстанавливающих условиях, составляет $> 97\%$.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 2–8°C в течение 12 месяцев, % мономера, как измерено методом HP-SEC, составляет $>98,5$.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 2–8°C в течение 12 месяцев, % высокомолекулярных соединений, как измерено методом HP-SEC, составляет $\leq 1,5\%$.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 25°C в течение 12 месяцев, % мономера, как измерено методом HP-SEC, составляет $>98,0\%$.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 25°C в течение 6 месяцев, % высокомолекулярных соединений, как измерено методом HP-SEC, составляет $\leq 2\%$.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 40 °C в течение 3 месяцев, % мономера, как измерено методом HP-SEC, составляет $>94,0\%$, $\geq 94,5\%$ или $\geq 95,0\%$.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

композициям антитела к человеческому PD-1, как описано в настоящей заявке, где после хранения композиции при 40°C в течение 3 месяцев, % высокомолекулярных соединений, как измерено методом HP-SEC, составляет $\leq 5,5\%$, $\leq 5,0\%$ или $\leq 4,4\%$.

Конкретные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения

В одном аспекте (A1), настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 5 mM до приблизительно 20 mM буфера; (c) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; (ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L-аргинина, фармацевтически приемлемой соли L-аргинина, L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и (iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% неионного поверхностно-активного вещества; и (e) приблизительно 1 mM до приблизительно 20 mM антиоксиданта.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) композиция имеет pH от 4,5 до 6,4.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) композиция имеет pH от 5,0 до 6,0.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) композиция имеет pH от 5,3 до 5,8.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) композиция имеет pH приблизительно 5,5.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) буфер представляет собой гистидин или ацетат.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) буфер включает приблизительно 10 mM гистидина.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) буфер включает приблизительно 10 mM L-гистидина.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) буфер включает приблизительно 10 mM ацетата.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об трегалозы.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об сорбитола.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли, и pH композиции находится на уровне от приблизительно 6,0 до приблизительно 6,4.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об аргинин-HCl.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-пролина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-пролина.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-пролин HCl.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 160 mM до приблизительно 200 mM глицина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) стабилизатор включает от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) неионное поверхностно-активное вещество включает от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) неионное поверхностно-активное вещество включает приблизительно 0,02% полисорбата 80.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) антиоксидант включает от приблизительно 1 mM до приблизительно 20 mM L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) антиоксидант включает от приблизительно 5 mM до приблизительно 15 mM L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) антиоксидант включает приблизительно 10 mM L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A1) антиоксидант представляет собой L-метионин.

В одном аспекте (A2) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 200

мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ буфера; (c) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; (ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и (iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% неионного поверхностно-активного вещества; и (e) приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ антиоксиданта.

В одном варианте осуществления аспекта (A2) композиция дополнительно включает от приблизительно 1% до приблизительно 3% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном аспекте (A3) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ гистидинового буфера; (c) приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы; (d) приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% масс/об полисорбата 80; и (e) приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A3) композиция дополнительно включает от приблизительно 1% до приблизительно 3% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A3) композиция дополнительно включает от приблизительно 1,25% до приблизительно 2,5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A3) гистидиновый буфер присутствует в концентрации от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ.

В одном варианте осуществления аспекта (A3) гистидиновый буфер представляет собой L-гистидин.

В одном варианте осуществления аспекта (A3) L-метионин или фармацевтически приемлемая соль присутствует в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ.

В одном варианте осуществления аспекта (A3) полисорбат 80 присутствует в массовом соотношении приблизительно 0,02% масс/об.

В одном варианте осуществления аспекта (A3) сахароза присутствует в массовом соотношении приблизительно 7% масс/об.

В одном аспекте (A4) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 75 до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; (c) от

приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы; и (e) от 0,01% до приблизительно 0,04% масс/об полисорбата 80.

В одном аспекте (A5) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 125 до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) приблизительно 10 мМ гистидинового буфера; (c) приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) приблизительно 7% масс/об сахарозы; и (e) приблизительно 0,02% масс/об полисорбата 80.

В одном варианте осуществления аспекта (A5) композиция дополнительно включает от приблизительно 1,25% до приблизительно 2,5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A5) композиция дополнительно включает от приблизительно 1,25% до приблизительно 2,5% масс/об L-аргинина.

В одном варианте осуществления аспекта (A5) композиция дополнительно включает от приблизительно 1,25% до приблизительно 2,5% масс/об L-аргинин-HCl.

В одном варианте осуществления аспекта (A5) композиция имеет pH от 5,0 до 6,0.

В одном варианте осуществления аспекта (A5) композиция имеет pH от 5,3 до 5,8.

В одном аспекте (A6) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; (c) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; (ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L-аргинина, фармацевтически приемлемой соли L-аргинина, L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и (iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A6) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающему фрагменту присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном аспекте (A7) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; (c) приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем масс/об сахарозы; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A7) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном варианте осуществления аспекта (A7) L-метионин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой L-метионин-HCl.

В одном аспекте (A8) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) приблизительно 8 mM до приблизительно 12 mM гистидинового буфера; (c) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об трегалозы; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 mM до приблизительно 10 mM метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A8) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном аспекте (A9) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) приблизительно 8 mM до приблизительно 12 mM гистидинового буфера; (c) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 mM до приблизительно 10 mM L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A9) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном аспекте (A10) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 8 mM до приблизительно 12 mM гистидинового буфера; (c) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита; (d) приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 mM до приблизительно 10 mM L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A10) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном аспекте (A11), настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1 включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) приблизительно 8 mM до приблизительно 12 mM гистидинового буфера; (c) от

приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об сорбитола; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A11) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном аспекте (A12) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; (c) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-пролина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A12) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном варианте осуществления аспекта (A12) L-пролин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой L-пролин.

В одном варианте осуществления аспекта (A12) L-пролин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой L-пролин HCl.

В одном аспекте (A13) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; (c) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A13) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном варианте осуществления аспекта (A13) композиция имеет pH от приблизительно 6,0 до приблизительно 6,4.

В одном варианте осуществления аспекта (A13) L-аргинин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой L-аргинин.

В одном варианте осуществления аспекта (A13) L-аргинин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой L-аргинин HCl.

В одном аспекте (A14) настоящее изобретение относится к композиции антитела к человеческому PD-1, включающей: (a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75

мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; (c) приблизительно 160 мМ до приблизительно 200 мМ глицина или его фармацевтически приемлемой соли; (d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и (e) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления аспекта (A14) антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.

В одном варианте осуществления аспекта (A14) глицин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой глицин.

В одном варианте осуществления аспекта (A14) глицин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой глицин HCl.

В одном варианте осуществления аспекта (A14) глицин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой глицин сукцинат.

В одном варианте осуществления любого из аспектов (A6) – (A14) композиция дополнительно включает металлохелатор.

В одном варианте осуществления любого из аспектов (A6) – (A14) композиция дополнительно включает DTPA, который присутствует в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 30 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов (A1) – (A14) композиция представляет собой жидкость.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов (A1) – (A14) композиция представляет собой восстановленный раствор из лиофилизированной композиции.

В любом из конкретных аспектов и вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, можно использовать любое анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим PD-1, например, пембролизумаб или его антигенсвязывающий фрагмент). В конкретных вариантах осуществления используют одно из анти-PD-1 антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящей заявке, например, описанных в разделе, озаглавленном Анти-PD-1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения любая из композиций, описанных в настоящей заявке, находится в водном растворе. В альтернативном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает лиофилизированные композиции, полученные путем лиофилизации водной композиции с получением восстановленной композиции по настоящему изобретению, как более подробно обсуждается ниже.

Ллиофилизированные фармацевтические композиции

Лиофилизированные композиции терапевтических белков обеспечивают некоторые преимущества. Лиофилизированные композиции обычно обеспечивают лучшую химическую стабильность, чем растворы композиций, и следовательно, увеличивают период полужизни. Лиофилизированная композиция также может быть восстановлена в различных концентрациях в зависимости от клинических факторов, таких как путь введения или дозировка. Например, лиофилизированная композиция может быть восстановлена при высокой концентрации (то есть в небольшом объеме), если это необходимо для подкожного введения, или при более низкой концентрации, если вводят внутривенно. Высокие концентрации также могут быть необходимы, если высокая дозировка требуется для конкретного пациента, особенно если вводят подкожно, где объем инъекции должен быть минимизирован. Одна такая лиофилизированная композиция антитела раскрыта в патенте США № 6267958, который включен в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Лиофилизированные композиции другого терапевтического белка раскрыты в патенте США № 7247707, который включен в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

Как правило, лиофилизированную композицию получают, предполагая восстановление при высокой концентрации лекарственного продукта (DP, в типичном варианте осуществления гуманизированного анти-PD-1 антитела пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента), *т.е.* предполагая восстановление в небольшом объеме воды. Затем можно легко использовать последующее разбавление водой или изотоническим буфером для разбавления DP до более низкой концентрации. Как правило, эксципиенты включают в лиофилизированную композицию по настоящему изобретению на уровнях, которые приводят к приблизительно изотонической композиции при восстановлении при высокой концентрации DP, например для подкожного введения. Восстановление в большем объеме воды, с получением более низкой концентрации DP, обязательно уменьшит тоничность восстановленного раствора, но такое снижение не имеет важного значения для не-подкожного, например внутривенного введения. Если изотоничность желательна при более низкой концентрации DP, лиофилизированный порошок может быть восстановлен в стандартном небольшом объеме воды и затем дополнительно разбавлен изотоническим разбавителем, таким как 0,9% хлорид натрия.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения гуманизированное анти-PD-1 антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) сформулировано в виде лиофилизированного порошка для восстановления и применения для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) обеспечивают в количестве примерно 50 мг/флакон и восстанавливают стерильной водой для инъекций перед использованием. При желании, восстановленное антитело может быть асептически разбавлено 0,9% инъекцией USP хлорида натрия в стерильном контейнере для внутривенных вливаний. В некоторых вариантах осуществления целевой pH восстановленной композиции составляет $5,5 \pm 0,5$. В различных вариантах осуществления лиофилизированная композиция по изобретению

обеспечивает восстановление анти-PD-1 антитела до высоких концентраций, таких как приблизительно 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150, 175 или более мг/мл.

Лиофилизированные композиции по определению являются по существу сухими, и, следовательно, концепция концентрации не является полезной для их описания. Описание лиофилизированной композиции в пересчете на массу компонентов во флаконе с единичной дозой является более полезным, но проблематичным, поскольку оно варьируется для разных доз или размеров флакона. При описании лиофилизированных композиций по настоящему изобретению полезно выразить количество компонента как отношение массы компонента к массе лекарственного вещества (DS) в том же образце (например, флаконе). Это соотношение может быть выражено в процентах. Такие соотношения отражают внутреннее свойство лиофилизированных композиций по изобретению, независимо от размера флакона, дозировки и протокола восстановления.

В других вариантах осуществления лиофилизированную композицию антитела к человеческому PD-1 или антигенсвязывающего фрагмента, определяют на основании раствора до лиофилизации, используемого для приготовления лиофилизированной композиции, такого как раствор до лиофилизации. В одном варианте осуществления раствор до лиофилизации содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации от приблизительно 10 мг/мл приблизительно 25 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл. Такие растворы до лиофилизации могут иметь pH 4,4–5,2 (включая приблизительно 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1 и 5,2), например, предпочтительно pH приблизительно 4,8 или pH приблизительно 5,5.

В других вариантах осуществления лиофилизированную композицию антитела к человеческому PD-1 или антигенсвязывающего фрагмента определяют в контексте восстановленного раствора, полученного из лиофилизированной композиции.

Восстановленные растворы могут включать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 или 100 мг/мл или в более высоких концентрациях, таких как 150 мг/мл, 167 мг/мл, 200 мг/мл или вплоть до приблизительно 250 мг/мл. Такие восстановленные растворы могут иметь pH приблизительно 5,5 или pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0

Лиофилизированные композиции по настоящему изобретению получают путем лиофилизации (лиофильной сушки) предварительного раствора для лиофилизации. Лиофильная сушка достигается путем замораживания композиции и последующей сублимации воды при температуре, подходящей для первичной сушки. В этих условиях температура продукта ниже точки эвтектики или температуры разрушения композиции. Как правило, температура полки для первичной сушки будет находиться в диапазоне примерно от -30 до 25°C (при условии, что продукт остается замороженным во время первичной сушки) при подходящем давлении, обычно в диапазоне от примерно 50 до 250 мТорр. Форма, размер и тип контейнера, содержащего образец (например, стеклянный флакон), и объем жидкости будут определять время, необходимое для сушки, которое может варьировать от нескольких часов до нескольких дней (например, 40–60 часов).

Вторичная стадия сушки может проводиться при температуре приблизительно 0–40°C, в зависимости, главным образом, от типа и размера контейнера и типа используемого белка. Время вторичной сушки определяется желаемым уровнем остаточной влаги в продукте и обычно составляет по меньшей мере приблизительно 5 часов. Как правило, содержание влаги в лиофилизированной композиции составляет менее примерно 5%, и предпочтительно менее примерно 3%. Давление может быть таким же, как и на этапе первичной сушки. Условия сублимационной сушки могут варьировать в зависимости от композиции и размера флакона.

В некоторых случаях может быть желательным лиофилизировать белковую композицию в контейнере, в котором должно быть осуществлено восстановление белка, чтобы избежать стадии переноса. Контейнером в этом случае может служить, например, флакон объемом 3, 5, 10, 20, 50 или 100 см³.

Ллиофилизированные композиции по настоящему изобретению восстанавливают перед введением. Белок может быть восстановлен при концентрации приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 или 100 мг/мл или при более высоких концентрациях, таких как 150 мг/мл, 200 мг/мл, 250 мг/мл или 300 мг/мл вплоть до приблизительно 500 мг/мл. Высокие концентрации белка особенно полезны, когда предполагается подкожная доставка восстановленной композиции. Однако для других путей введения, таких как внутривенное введение, могут быть желательны более низкие концентрации белка (*например*, приблизительно 5–50 мг/мл).

Восстановление обычно происходит при температуре приблизительно 25°C для обеспечения полной гидратации, хотя при желании можно использовать и другие температуры. Время, необходимое для восстановления, будет зависеть, например, от типа разбавителя, количества эксципиента(ов) и белка. Типичные разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH буферный раствор (например, фосфатно–солевой буферный раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Настоящее изобретение относится к жидкой композиции антитела к человеческому PD-1, которая восстановлена из лиофилизированной композиции, где восстановленный раствор включает: а) от приблизительно 125 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента; б) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера; в) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из: (i) от приблизительно 3% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы; (ii) от приблизительно 2% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли; (iii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% маннита и приблизительно 1% до приблизительно 2% сахарозы, и (iv) комбинации i) и ii); и d) приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80.

В вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы.

В вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизатор включает

приблизительно 2% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

В вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% маннита и приблизительно 1% до приблизительно 2% сахарозы.

В вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизатор включает приблизительно 4% до приблизительно 4,5% маннита и приблизительно 1% до приблизительно 2% сахарозы.

В вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы и приблизительно 2% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли. В конкретных вариантах осуществления стабилизатор включает сахарозу и L-аргинин. В других вариантах осуществления стабилизатор включает сахарозу и L-аргинин-HCl.

В конкретных вариантах осуществления стабилизатор включает комбинации 2–4% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли и 3,5–6% масс/об сахарозы. В других вариантах осуществления стабилизатор включает комбинацию приблизительно 3% L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли и приблизительно 5,5% сахарозы. В других вариантах осуществления стабилизатор включает комбинацию приблизительно 2% L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли и приблизительно 5% сахарозы. В других вариантах осуществления стабилизатор включает комбинацию приблизительно 2% L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли и приблизительно 3,7% сахарозы.

Жидкие фармацевтические композиции

Жидкую композицию антител можно получить, взяв лекарственное вещество (например, гуманизированное анти-PD-1), которое находится в жидкой форме (например, пембролизумаб в водной фармацевтической композиции), и буфер, заменив его на желаемый буфер в качестве последней стадии процесса очистки. В этом варианте осуществления стадия лиофилизации отсутствует. Лекарственное вещество в конечном буфере концентрируют до желаемой концентрации. Эксципиенты, такие как сахароза, метионин и полисорбат 80, добавляют к лекарственному веществу и его разбавляют, используя соответствующий буфер, до конечной концентрации белка. Конечное сформулированное лекарственное вещество фильтруют, например, используя фильтры 0,22 мкм, и помещают в конечный контейнер (например, стеклянные флаконы или шприцы). Такая жидкая композиция служит примером конечной жидкой композиции, содержащей 10 мМ гистидина pH 5,5, 7% сахарозы, 0,02% полисорбата 80, 25–200 мг/мл пембролизумаба и 1,5–2,5% аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

III. Способы применения

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества любой из композиций по

настоящему изобретению; т.е., любой композиции, описанной в настоящей заявке (включая композиции по настоящему изобретению, определенные в качестве аспектов (A1)–(A14) в разделе настоящей заявки Конкретные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения (далее именуемые как “аспекты (A1)–(A14)”). В некоторых вариантах осуществления этого способа композицию вводят пациенту посредством внутривенного введения. В других вариантах осуществления композиции вводят пациенту путем подкожного введения.

В любом из способов по настоящему изобретению рак может быть выбран из группы, включающей: меланому, рак легких, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудочно–кишечного тракта, множественную миелому, гепатоцеллюлярный рак, лимфому, рак почки, мезотелиому, рак яичников, рак пищевода, анальный рак, рак желчных путей, колоректальный рак, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак слюнных желез, рак предстательной железы (например, гормонорефрактерная аденокарцинома предстательной железы), рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак пищевода, рак печени, рак щитовидной железы, глиобластома, глиому и другие злокачественные новообразования.

В некоторых вариантах осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких.

В альтернативных вариантах осуществления рак легких представляет собой мелкоклеточный рак легких.

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 лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В–клеточную лимфому (DLBCL).

В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой тройной негативный рак молочной железы.

В других вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой ER+/HER2– рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак мочевого пузыря представляет собой уротелиальный рак.

В некоторых вариантах осуществления рак головы и шеи представляет собой рак носоглотки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак щитовидной железы. В других вариантах осуществления рак представляет собой рак слюнных желез. В других вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический колоректальный рак с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI–H).

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

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль с высокой мутационной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, включающей: меланому, немелкоклеточный рак легких, рецидивирующую или рефрактерную классическую лимфому Ходжкина, плоскоклеточный рак головы и шеи, уротелиальный рак, рак пищевода, рак желудка, DLBCL и гепатоцеллюлярный рак.

В других вариантах осуществления вышеуказанных способов лечения рак представляет собой злокачественную опухоль Гема. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль Гема представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфолейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз (CML), DLBCL, EBV-позитивный DLBCL, первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому; крупноклеточную В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками и/или гистиоцитами; фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина (HL), лимфому из мантийных клеток (MCL), множественную миелому (MM), миелоидный лейкоз 1 (Mcl-1), миелодиспластический синдром (MDS), неходжкинскую лимфому (NHL) или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL).

Злокачественные новообразования, которые демонстрируют улучшенную безрецидивную и общую выживаемость в отношении присутствия инфильтрирующих опухоль лимфоцитов в биопсии или хирургическом материале, *например*, меланоме, кишечнике, печени, почках, желудке/пищевод, молочной железе, поджелудочной железе и яичнике, охвачены в способах лечения, описанных в настоящей заявке. Известно, что такие подтипы рака подвержены иммунному контролю со стороны Т-лимфоцитов. Кроме того, включены рефрактерные или рецидивирующие злокачественные новообразования, рост которых можно ингибировать с использованием антител, описанных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению (например, аспекты (A1)–(A14)) вводят пациенту, имеющему рак, характеризующийся повышенной экспрессией PD-L1 и/или PD-L2 в тестируемых образцах ткани, включая: рак яичника, почек, кишечника, поджелудочной железы, молочной железы, печени, желудка, пищевода и меланому. Дополнительные виды рака, для которых может быть полезно лечение анти-PD-1 антителами, такими как гуманизированное анти-PD-1 антитело пембролизумаб, включают раковые заболевания, связанные с персистирующей инфекцией вирусами, такими как вирусы иммунодефицита человека, вирусы гепатита класса А, В и С, вирус Эпштейна-Барра, вирусы папилломы человека, о которых известно, что они причинно связаны, например, с саркомой Капоши, раком печени, раком носоглотки, лимфомой, раком шейки матки, вульвы, анальным раком, раком полового члена и раком полости рта.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения

рака у пациента–человека, включающий введение пациенту любой композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения неоперабельной или метастатической меланомы у пациента–человека, включающий введение пациенту любой композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения метастатического немелкоклеточного рака легких (NSCLC) у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В конкретных вариантах осуществления пациент имеет опухоль с высокой экспрессией PD–L1 [(балл пропорции опухоли (TPS) $\geq 50\%$)] и ранее не получал лечение платина–содержащей химиотерапией. В других вариантах осуществления пациент имеет опухоль с экспрессией PD–L1 (TPS $\geq 1\%$) и ранее получал лечение платина–содержащей химиотерапией. В еще одних вариантах осуществления пациент имеет опухоль с экспрессией PD–L1 (TPS $\geq 1\%$) и ранее не получал лечение платина–содержащей химиотерапией. В конкретных вариантах осуществления пациент имел прогрессирование заболевания на момент или после получения платина–содержащей химиотерапии.

В некоторых вариантах осуществления PD–L1 TPS определяют при помощи апробированного FDA теста.

В некоторых вариантах осуществления опухоль пациента не имеет EGFR или ALK геномных аберраций.

В некоторых вариантах осуществления опухоль пациента имеет EGFR или ALK геномную аберрацию и имела прогрессирование заболевания во время или после получения лечения EGFR или ALK аберрации (аберраций) перед получением анти–PD–1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения метастатического немелкоклеточного рака легких (NSCLC) у пациента–человека, включающий: (1) введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)), и (2) введение пеметрекседа и карбоплатина пациенту. В конкретных вариантах осуществления пациент ранее не лечился противораковым терапевтическим средством до начала схемы комбинированного лечения с использованием композиции по настоящему изобретению, пеметрекседа и карбоплатина.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легких.

В некоторых вариантах осуществления пеметрексед вводят пациенту в количестве 500 мг/м^2 . В подвариантах осуществления пеметрексед вводят пациенту посредством внутривенной инфузии каждые 21 день. В конкретных вариантах осуществления время инфузии составляет приблизительно 10 минут.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, где пациента лечат

композицией по изобретению в комбинации с пеметрекседом, изобретение дополнительно включает введение пациенту от приблизительно 400 мкг до приблизительно 1000 мкг фолиевой кислоты один раз в день, начиная примерно за 7 дней до введения пеметрекседа пациенту и продолжая примерно до 21 дня после того, как пациенту вводят последнюю дозу пеметрекседа. В некоторых вариантах осуществления фолиевую кислоту вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно включает введение пациенту приблизительно 1 мг витамина B₁₂ приблизительно за 1 неделю до первого введения пеметрекседа и приблизительно каждые три цикла введения пеметрекседа (то есть приблизительно каждые 9 недель). В некоторых вариантах осуществления витамин B₁₂ вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно включает введение приблизительно 4 мг дексаметазона пациенту два раза в день за день до, в день и на следующий день после введения пеметрекседа. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят перорально.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рецидивирующего или метастатического плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) у пациента–человека, включающий введение пациенту любой композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В некоторых вариантах осуществления пациент ранее получал лечение платина–содержащей химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления пациент имел прогрессирование заболевания на момент или после получения платина–содержащей химиотерапии.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рефрактерной классической лимфомы Ходжкина (сHL) у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В некоторых вариантах осуществления у пациента рецидив после 3 или более линий терапии для лечения сHL. В конкретных вариантах осуществления пациент является взрослым пациентом. В альтернативных вариантах осуществления пациент является педиатрическим пациентом.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения местно–распространенной или метастатической уротелиальной карциномы у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В некоторых вариантах осуществления пациенту не показана цисплатин–содержащая химиотерапия. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет прогрессирование заболевания во время или после платина–содержащей химиотерапии или в течение 12 месяцев после неoadъювантного или адъювантного лечения платина–содержащей химиотерапией.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения неоперабельных или метастатических, с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI–H) или с дефицитом репарации неспаренных оснований солидных опухолей у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему

изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В конкретных вариантах осуществления пациент имел прогрессирование заболевания после предшествующего противоракового лечения.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения неоперабельного или метастатического, с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или с дефицитом репарации неспаренных оснований колоректального рака у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В конкретных вариантах осуществления пациент имел прогрессирование заболевания после предшествующего лечения фторпиримидином, оксалиплатином и иринотеканом.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение включает способ лечения рецидивирующего локально распространенного или метастатического рака желудка у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рецидивирующего локально распространенной или метастатической аденокарциномы гастроэзофагеального перехода у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В конкретных вариантах осуществления опухоль пациента экспрессирует PD-L1 [комбинированный положительный балл (CPS) ≥ 1]. В конкретных вариантах осуществления пациент имеет прогрессирование заболевания при или после двух или более предшествующих линий терапии, включая фторпиримидин– и платина–содержащую химиотерапию. В конкретных вариантах осуществления пациент имеет прогрессирование заболевания при или после двух или более предшествующих линий терапии, включая HER2/neu–направленную терапию.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рака у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)), где пациент имеет рак, выбранный из группы, включающей: меланому, рак легких, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудочно–кишечного тракта, множественную миелому, гепатоцеллюлярный рак, лимфому, рак почки, мезотелиому, рак яичников, рак пищевода, анальный рак, рак желчных путей, колоректальный рак, рак шейки матки, рак щитовидной железы и рак слюнных желез.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения мелкоклеточного рака легких у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)).

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение включает способ лечения неходжкинской лимфомы у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В конкретных вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой

медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому. В конкретных вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рака молочной железы у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)). В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой тройной негативный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой ER+/HER2–рак молочной железы.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рака носоглотки у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рака щитовидной железы у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ лечения рака слюнных желез у пациента–человека, включающий введение пациенту композиции по настоящему изобретению (например, по аспектам (A1)–(A14)).

Антагонистические анти–PD–1 антитела или фрагменты антител также можно использовать для предотвращения или лечения инфекций и инфекционных заболеваний. Таким образом, изобретение относится к способу лечения хронической инфекции у пациента–млекопитающего, включающему введение пациенту эффективного количества композиции по настоящему изобретению. В некоторых конкретных вариантах осуществления этого способа композицию вводят пациенту посредством внутривенного введения. В других вариантах осуществления композицию вводят пациенту путем подкожного введения.

Эти средства можно использовать отдельно или в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для стимуляции иммунного ответа на вирусы, инфекционные для человека, включая, но не ограничиваясь этим: вирусы иммунодефицита человека, вирусы гепатита класса А, В и С, вирус Эпштейна–Барра, цитомегаловирус человека, вирусы папилломы человека и вирусы герпеса. Антагонистические анти–PD–1 антитела или фрагменты антител можно использовать для стимуляции иммунного ответа на инфекцию бактериальными или грибковыми паразитами и другими патогенными микроорганизмами. Вирусные инфекции гепатит В и С и ВИЧ относятся к числу тех, которые считаются хроническими вирусными инфекциями.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в комбинации с одним или несколькими “дополнительными терапевтическими средствами”. Дополнительное терапевтическое средство может представлять собой биотерапевтическое средство (включая, но не ограничиваясь этим, антитела к VEGF, EGFR, Her2/neu,

рецепторам VEGF, другим рецепторам фактора роста, CD20, CD40, CD-40L, OX-40, 4-1BB и ICOS); средство, ингибирующее рост; иммуногенное средство (например, аттенуированные раковые клетки, опухолевые антигены, антиген-презентирующие клетки, такие как дендритные клетки с введенным в них выделенным 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 не ограничиваясь этим GM-CSF).

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического средства. В конкретных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой анти-LAG3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-CD27 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой вектор на основе вируса болезни Ньюкасла, экспрессирующий IL-12. В дополнительном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой динациклиб. В других дополнительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой агонист STING.

Подходящие пути введения могут, например, включать парентеральную доставку, включая внутримышечную, подкожную, а также интратекальную, прямую внутрижелудочковую, внутривенную, внутрибрюшинную. Лекарственные средства можно вводить различными общепринятыми способами, такими как внутрибрюшинные, парентеральные, внутриартериальные или внутривенные инъекции. Способы введения, в которых объем раствора должен быть ограничен (например, подкожное введение), требуют лиофилизированной композиции, позволяющей осуществлять восстановление при высокой концентрации.

Выбор дозировки дополнительного терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включая скорость оборота соединения в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность соединения и доступность клеток-мишеней, ткани или органа у индивидуума, получающего лечение. Дозировка дополнительного терапевтического средства должна составлять такое количество, которое обеспечивает приемлемый уровень побочных эффектов. Соответственно, величина дозы и частота введения каждого дополнительного терапевтического средства (например, биотерапевтического или химиотерапевтического средства) будут частично зависеть от конкретного терапевтического средства, тяжести рака, подлежащего лечению, и характеристик пациента. Руководство по выбору подходящих доз антител, цитокинов и малых молекул является доступным. 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). Подходящий режим дозирования может определить клиницист, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области как воздействующих на лечение, или прогнозируемых как влияющих на лечение, и он будет зависеть, например, от истории болезни пациента (например, предыдущей терапии), типа и стадии рака, подлежащего лечению, и биомаркеров ответа на одно или несколько терапевтических средств в комбинированной терапии.

Различные литературные ссылки доступны для облегчения выбора фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов для дополнительного терапевтического 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 и Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

Фармацевтическую композицию антител можно вводить путем непрерывной инфузии или дозами с интервалами, например один день, 1–7 раз в неделю, одну неделю, две недели, три недели, ежемесячно, раз в два месяца и т.д. Предпочтительным протприблизительном введения является протокол с максимальной дозой или частотой введения, который позволяет избежать значительных нежелательных побочных эффектов. Общая недельная доза обычно 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. Требуемая доза низкомолекулярного терапевтического средства, например пептидного миметика, натурального продукта или органического химического вещества, примерно такая же, как для антитела или полипептида, в пересчете на моль/кг.

В некоторых вариантах осуществления дозирование будет включать введение пациенту увеличивающихся доз 1,0, 3,0 и 10 мг/кг фармацевтической композиции, *т.е.* композиции, включающей пембролизумаб, во время курса лечения. Композиция, включающая пембролизумаб, может быть восстановленной жидкой композицией или

может быть жидкой композицией, ранее не лиофилизированной. Продолжительность курса может варьировать и может продолжаться до тех пор, пока не будут получены желаемые эффекты. В некоторых вариантах осуществления повышение дозы будет продолжаться до дозы приблизительно 10 мг/кг. В определенных вариантах осуществления у пациента будет гистологический или цитологический диагноз меланомы или другой формы солидной опухоли, и в некоторых случаях пациент может иметь неизмеряемое заболевание. В некоторых вариантах осуществления пациент будет лечиться другими химиотерапевтическими средствами, тогда как в других вариантах осуществления пациент будет представлять собой ранее не леченного пациента.

В других дополнительных вариантах осуществления режим дозирования будет включать введение дозы 1, 3 или 10 мг/кг любой из фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке (*т.е.*, композиции, включающей пембролизумаб), в течение всего курса лечения. Для такого постоянного режима дозирования интервал между дозами будет приблизительно 14 дней (± 2 дня). В некоторых вариантах осуществления интервал между дозами будет составлять приблизительно 21 дня (± 2 дня).

В некоторых вариантах осуществления режим дозирования будет включать введение дозы от приблизительно 0,005 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, с повышением дозы для индивидуального пациента. В некоторых вариантах осуществления дозу 5 мг/кг или 10 мг/кг будут вводить с интервалами каждые 3 недели или каждые 2 недели. В еще одних дополнительных вариантах осуществления дозу 3 мг/кг будут вводить с трехнедельными интервалами для пациентов с меланомой или пациентов с другими солидными опухолями. В этих вариантах осуществления пациенты должны иметь неоперабельное заболевание; однако, пациенты могли иметь предшествующую операцию.

В некоторых вариантах осуществления пациенту в течение 30 минут вводят внутривенную инфузию любой из фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления для повышения дозы интервал между введениями первой и второй дозы будет составлять приблизительно 28 дней (± 1 день). В некоторых вариантах осуществления интервал между второй и третьей дозами будет составлять приблизительно 14 дней (± 2 дня). В некоторых вариантах осуществления интервал будет составлять приблизительно 14 дней (± 2 дня) для доз, следующих за второй дозой.

В некоторых вариантах осуществления использование клеточно-поверхностных маркеров и/или цитокиновых маркеров, как описано в WO2012/018538 или WO2008/156712, будут использовать в биоанализах для мониторинга, диагностики, отбора пациентов и/или схем лечения, включающих блокаду пути PD-1.

Подкожное введение можно осуществить путем инъекции с использованием шприца или с использованием других инъекционных устройств (например, устройства Inject-ease[®]); ручек-шприцов; или безыгольных устройств (например, MediJector и BioJector[®]).

Варианты осуществления настоящего изобретения также включают одну или

несколько биологических композиций, описанных в настоящей заявке (i) для применения в, (ii) для использования в качестве лекарственного средства или композиции для, или (iii) для применения в получении лекарственного средства для: (a) терапии (например, организма человека); (b) медицины; (c) индукции или усиления противоопухолевого иммунного ответа; (d) уменьшения количества одного или нескольких опухолевых маркеров у пациента; (e) остановки или задержки роста опухоли или рака крови; (f) остановки или задержки прогрессирования заболевания, связанного с PD-1; (g) остановки или задержки прогрессирования рака; (h) стабилизации заболевания, связанного с PD-1; (i) ингибирования роста или выживания опухолевых клеток; (j) устранения или уменьшения размера одного или нескольких раковых поражений или опухолей; (k) уменьшения прогрессирования, проявления или тяжести заболевания, связанного с PD-1; (l) уменьшения тяжести или продолжительности клинических симптомов заболевания, связанного с PD-1, такого как рак; (m) продления выживаемости пациента относительно ожидаемой выживаемости у аналогичного не получавшего лечения пациента; n) индукции полной или частичной ремиссии ракового состояния или другого заболевания, связанного с PD-1, или o) лечения рака.

ОБЩИЕ СПОСОБЫ

Стандартные методы в 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 методы также описаны в Ausbel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1–4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, в котором описано клонирование в бактериальных клетках и ДНК мутагенез (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

Способы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию описаны в (Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, продукция слитых белков, гликозилирование белков описаны (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). Описано получение, 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, *supra*). Доступны стандартные методы для характеристики взаимодействий

лиганд/рецептор (см., *например*, Coligan, et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Моноклональные, поликлональные и гуманизированные антитела можно получить как описано (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 № 6329511).

Альтернативой гуманизации является использование библиотек человеческих антител, представленных на библиотеках фагов или человеческих антител, у трансгенных мышей (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 генерации антител. Животных можно иммунизировать клетками, несущими интересующий антиген. Спленоциты могут быть затем выделены у иммунизированных животных, и спленоциты могут быть слиты с клеточной линией миеломы для создания гибридомы (см., *например*, Meyaard et al. (1997) Immunity 7:283–290; Wright et al. (2000) Immunity 13:233–242; Preston et al., *supra*; Kaithamana et al. (1999) J. Immunol. 163:5157–5164).

Антитела могут быть конъюгированы, например, с небольшими молекулами лекарственного средства, ферментами, липосомами, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Антитела полезны для терапевтических, диагностических, в наборах или для других целей и включают антитела, связанные, например, с красителями, радиоизотопами, ферментами или металлами, например, коллоидным золотом (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).

Известны методы проточной цитометрии, включая флуоресцентную 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, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, включая нуклеиновокислотные праймеры и зонды, полипептиды и антитела, для использования, например, в качестве диагностических реагентов (Molecular Probesy (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003)

Catalogue, St. Louis, MO).

Описаны стандартные методы 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 программ и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, укладки белков, функциональных доменов, сайтов гликозилирования и выравниваний 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. Snocooby Programs Biomed.* 68:177–181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17–21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683–4690).

Аналитические методы

Аналитические методы, подходящие для оценки стабильности продукта, включают эксклюзионную хроматографию (SEC), метод динамического рассеяния света (DLS), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), количественное определение iso–asp, эффективность, 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 процентное содержание 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. УФ при 340 нм измеряет интенсивность рассеянного света при 340 нм и дает информацию о количестве растворимых и нерастворимых агрегатов. УФ–спектроскопия измеряет поглощение 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 амид I и дает информацию о вторичной структуре белка.

Содержание iso–asp в образцах измеряют с использованием Isoquant Isoaspartate Detection System (Promega). В наборе используют фермент протеин–изоаспартилметилтрансферазу (PIMT) для специфической детекции присутствия остатков изоаспарагиновой кислоты в целевом белке. PIMT катализирует перенос метильной группы из S–аденозил–L–метионина в изоаспарагиновую кислоту в положении α–карбоксила, генерируя S–аденозил–L–гомоцистеин (SAH) в этом способе. Это относительно небольшая молекула, и ее обычно можно выделить и количественно определить методом обращенно–фазовой ВЭЖХ с использованием SAH–ВЭЖХ

стандартов, представленных в наборе.

Эффективность или биоидентичность антитела можно измерить по его способности связываться с его антигеном. Специфическое связывание антитела с его антигеном может быть определено количественно любым способом, известным специалистам в данной области, например иммуноанализом, таким как ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Все публикации, указанные в настоящей заявке, включены в качестве ссылки с целью описания и раскрытия методологий и материалов, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением.

Хотя различные варианты осуществления настоящего изобретения описаны в настоящей заявке со ссылкой на прилагаемые чертежи, следует понимать, что изобретение не ограничивается этими точными вариантами осуществления, и что специалисты в данной области техники могут осуществить различные изменения и модификации без отступления от объема или сущности изобретения, определенных в прилагаемой формуле изобретения.

Пример 1

Материалы и методы

CE-SDS: образцы анализировали методом CE-SDS, в котором белок денатурировали додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и разделяли при помощи капиллярного электрофореза (CE) (система Beckman-Coulter ProteomeLab PA800 CE и Набор для анализа чистоты/гетерогенности IgG). Метод разделяет белки на основе их кажущейся молекулярной массы. В невосстанавливающих условиях все виды, кроме основного пика IgG, были классифицированы как примеси. В восстанавливающих условиях IgG был разделен на тяжелые и легкие цепи. Все остальные виды были классифицированы как примеси. В обоих случаях результат был представлен как процент скорректированной площади каждого пика, рассчитанный из общего процента скорректированной площади пиков.

HP-IEX: Высокоэффективную ионообменную хроматографию (HP-IEX) использовали для оценки профиля заряда. Метод ионообменной ВЭЖХ осуществляли с использованием колонки Dionex Dionex ProPac WCX-10 и УФ-детектора при 280 нм. Образцы разбавляли в очищенной воде и для анализа вводили 80 мкг. Подвижная фаза, используемая для анализа IEX, представляла собой градиент следующих подвижных фаз (подвижная фаза А: 24 mM MES, pH 6,4% ацетонитрила (об/об); подвижная фаза В: 20 mM фосфата, 95 mM NaCl, pH 8,4% ацетонитрила (об/об)). Основной пик является главным компонентом хроматограммы и служит в качестве контроля для характеристики кислотных и щелочных вариантов. Кислотные варианты элюируют раньше, чем главный пик, и основная причина образования кислотных вариантов связана с дезамидированием Asp в главном пике и присутствием сиаловой кислоты по сравнению с главным пиком. щелочные варианты элюируют позже, чем главный пик, и основная причина образования

щелочных вариантов связана с неполным удалением C–концевого Lys из главного пика. Другими причинами являются неполная циклизация N–концевого глутамина (Gln) в пироглу легкой цепи или тяжелой цепи или обеих, а также из-за изомеризации Asp в главном пике до isoAsp.

HP–SEC: Чистоту образца оценивали при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC), в которой определяли процентное содержание мономера, а также процентное содержание высокомолекулярных частиц (HMW) и поздно элюирующих пиков (LMW виды). Присутствие HMW видов указывает на агрегаты белка, а присутствие LMW видов указывает на фрагменты белка. Высокоэффективную – эксклюзионную хроматографию (HP–SEC) осуществляли путем разбавления образцов водой до 1,0 мг/мл. Разбавленные образцы впрыскивали (10 мкл) в систему ВЭЖХ, снабженную колонкой YMC–pack–Diol 200 и УФ–детектором. Белки в образце разделяли по размеру и определяли по УФ–поглощению при 280 нм.

HP–SEC Arg: Чистоту образца оценивали при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC), в которой определяли процентное содержание мономера, а также процентное содержание высокомолекулярных частиц (HMW) и поздно элюирующих пиков (виды LMW). Высокоэффективную – эксклюзионную хроматографию (HP–SEC) осуществляли путем разбавления образцов до 5,0 мг/мл в подвижной фазе (50 мМ фосфата натрия, 450 мМ аргинин моногидрохлорида, pH 7,0). Температуру колонки устанавливали при 25°C и скорость потока поддерживали при 0,5 мл/мин с использованием изократического элюирования. Разбавленные образцы впрыскивали (30 мкл) в систему ВЭЖХ, снабженную колонкой YMC –PACK Diol–200 и УФ–детектором. Белки в образце разделяли по размеру и определяли по УФ–поглощению при 280 нм.

A350: УФ–поглощение при 350 нм измеряли с использованием 96–луночного планшет–ридера Spectramax как показатель мутности. Показания абсорбции соотносили с показаниями пустого планшета и нормализовали по длине пути прохождения образца.

HP–HIC: Высокоэффективную хроматографию гидрофобного взаимодействия (HP–HIC) использовали для оценки окисленных продуктов из не окисленной молекулы. Определяли процент пиков перед главным пиком, определенных как окисленные частицы, включающие окисление Met105 тяжелой цепи на одной тяжелой цепи согласно предыдущей аналитической характеристике, а также определяли процент главного и процент пиков после главного пика. HP–HIC метод осуществляли путем разбавления образца до 5,0 мг/мл в очищенной воде. Затем образец впрыскивали (10 мкл) в систему ВЭЖХ, снабженную колонкой Tosoh Phenyl–5PW и УФ–детектором при 280 нм. Для HIC анализа использовали подвижную фазу, содержащую градиент следующих компонентов (подвижная фаза А: 5 мМ фосфата натрия в 2% ацетонитриле, pH 7,0; подвижная фаза В: 400 мМ сульфата аммония, 5 мМ фосфата натрия в 2% ацетонитриле, pH 6,9).

VP–DSC: Дифференциальную сканирующую калориметрию Валериана Плотникова (VP–DSC) можно использовать для определения термической и конформационной стабильности моноклональных антител. DSC определяет теплоемкость

(Ср) раствора белка по сравнению с теплоемкостью раствора плацебо для повышающихся температур, создавая тепловой переход при разворачивании белка. Для моноклональных антител на термограмме DSC (Tonset, Tm1, Tm2) обычно видны множественные переходы разворачиваний (Tonset, Tm1, Tm2), соответствующие разворачиванию отдельных доменов.

Пример 2

Оценка стабильности композиций с высокой концентрацией пембролизумаба

Первоначальное исследование было выполнено для оценки стабильности композиций, содержащих высокую (160 мг/мл) концентрацию пембролизумаба, и для оценки влияния различных эксципиентов композиций.

Исходные растворы лекарственного вещества пембролизумаба получали в 10 мМ ацетата pH 5,0 (189 мг/мл) и 10 мМ гистидина pH 5,5 (187 мг/мл) путем фильтрации в тангенциальном потоке. Композиции пембролизумаба получали до целевой концентрации 160 мг/мл путем добавления в исходный раствор белка исходных растворов эксципиента и соответствующего буфера. Тестируемые композиции, содержащие высокую концентрацию пембролизумаба (см. Таблицу 4), получали в 6R стеклянных флаконах в объеме от 3 до 4 мл. Эксципиенты вводили в раствор белка для достижения целевых уровней каждого эксципиента и доводили до конечного объема с использованием ацетатного или гистидинового буфера. Композицию 2 получали в концентрации 125 мг/мл (без поверхностно-активного вещества) и концентрировали до более чем 160 мг/мл, используя устройство Millipore centricon (10000 MMCO). PS80 добавляли после того, как концентрация была доведена до 160 мг/мл с помощью плацебо (т.е. сформулированной матрицы со всеми компонентами, кроме Ab и поверхностно-активного вещества). Образцы хранили при 2–8°C после получения до их загрузки в флаконы.

Таблица 4

Композиции с высокой концентрацией пембролизумаба

Композиция	Концентрация пембро	Буфер	Стабилизатор	Поверхностно-активное вещество	Антиоксидант
1	160 мг/мл	Гистидин	7% сахарозы	0,02% PS80	—
2	160 мг/мл	Гистидин	5% сорбита	0,02% PS80	—
3	160 мг/мл	Гистидин	7% сахарозы	0,1% F127	—
4	160 мг/мл	Гистидин	7% сахарозы	0,02% PS80	10 мМ Met
5	160 мг/мл	Ацетат	7% сахарозы	0,02% PS80	—

Сформулированные растворы пембролизумаба фильтровали с использованием фильтра Millex GV 0,22 мкм PVDF 33мм и загружали в стеклянные флаконы для ВЭЖХ с низким объемом (Waters #186000384с, 12×32мм стеклянный флакон с завинчивающейся крышкой, 200 мкл на флакон). Флаконы закрывали крышками и крышки обматывали парафильмом, чтобы минимизировать возможное испарение. Образцы размещали в камеры для исследования стабильности при 2–8°C, 25°C и 40°C. Каждую емкость для

проб дважды упаковывали в мешки перед помещением в камеру для исследования стабильности на двенадцать недель.

Стабильность композиций оценивали с использованием HP-SEC (для оценки чистоты) и HP-IEC (профиль заряда) в течение двенадцати недель. Результаты демонстрируют, что не было никаких изменений ни для одной из композиций, которые хранились при 5°C (как используется в описании и во всех примерах, термин “5°C” используется взаимозаменяемо с “2–8°C”, что означает 5°C $\pm$ 3°C (стандартное отклонение) в течение 12-недельного периода времени. Поэтому все композиции считались стабильными в условиях хранения 5°C. При 25°C изменения наблюдали посредством HP-SEC (небольшое снижение % mAb) и HP-IEC (небольшое снижение % главного пика) для каждой из композиций в течение периода проведения испытания. Не было обнаружено различий между результатами для пяти композиций при 25°C с использованием любого из этих двух методов (данные не показаны). Более выраженные изменения наблюдались для всех композиций, хранившихся при 40°C, оцененных по обоим методикам, по сравнению с теми же композициями, хранившимися при 25°C. Наименьшее снижение % mAb по данным HP-SEC через 12 недель наблюдали для композиции 4 при 40°C по сравнению с другими композициями, хранившимися при 40°C в течение 12 недель, что позволяет предположить, что эта композиция может иметь улучшенную стабильность (данные не показаны). Не было различий в профиле заряда между пятью композициями при любой из температур в течение периода испытания (то есть данные через каждые 4 недели были одинаковыми для пяти композиций). Данные не показаны.

Окисление метионина–105 (Met–105) также контролировали при помощи HP-NIC для каждой из тестируемых композиций в течение 12-недельного периода. Никаких изменений в окислении Met–105 не наблюдали ни для одной из композиций при 5°C (Фиг. 1A). При 25°C наблюдали тенденцию небольшого увеличения % общего пика перед главным пиком 1 +2 (представляющего приблизительно 50% окисленного Met–105 или один окисленный Met–105 на молекулу) для всех пяти композиций (Фиг. 1B), которое было более выраженным при 40°C (Фиг. 1C). Наименьшее количество % общего пика перед главным пиком 1 +2 наблюдали для композиции 4 в течение 12-недельного периода, предполагая, что эта композиция может иметь улучшенную стабильность.

Пример 3

Оценка стабильности композиций с высокой концентрацией пембролизумаба, содержащих аргинин в качестве снижающего вязкость агента

Дальнейшее исследование осуществляли для оценки стабильности композиций, содержащих еще более высокую концентрацию пембролизумаба (200 мг/мл по сравнению с 160 мг/мл, используемой в Примере 2). В этом исследовании аргинин (3%, 2%) использовали в качестве снижающего вязкость агента, отдельно или в комбинации с сахарозой, и оценивали влияние пембролизумаба на стабильность при хранении.

Для этого исследования концентрированное лекарственное вещество

пембролизумаб получали в концентрации 234 мг/мл в 10 мМ гистидина pH 5,4 путем концентрирования и диафильтрации. Композиции лекарственного средства пембролизумаба (#1 – #3) получали до целевой концентрации 200 мг/мл в 200–мл мерных колбах путем введения в исходный раствор белка исходных растворов эксципиента и 10 мМ гистидинового буфера (см. Таблицу 5). Каждый из сформулированных растворов фильтровали с использованием 0,22 мкм PVDF мембранных устройств Stericup 250 мл и заполняли ими 1–мл шприцы (Нурак SCF 1 мл с пробками BD Нурак SCF) и 2–мл флаконы (Nuova Ompi 0612090.5657) с объемом лекарственного продукта 1 мл. Образцы разделяли, защищали от света и помещали в камеру для исследования стабильности при температуре 2–8°C на 12 месяцев, камеру для исследования стабильности при 25°C на 9 месяцев и камеру для исследования стабильности при 40°C на 5 месяцев. Тестируемые композиции для этого исследования не содержали никакого антиоксиданта.

Таблица 5

Композиции с высокой концентрацией пембролизумаба для Примера 3

Анти тело	Буфер	№	Стабилизатор 1	Стабилизатор 2	Поверхностно– активное вещество	Контейнер (наполнение)
200 мг/мл Пембро	10 мМ His pH 5,5	1A	7% Сахарозы	–	0,02% PS80	2–мл стеклянные флаконы (1 мл)
		2A	–	3% аргинина	0,02% PS80	
		3A	2% Сахарозы	2% аргинина	0,02% PS80	
		1B	7% Сахарозы	–	0,02% PS80	1–мл BD шприцы (1 мл)
		2B	–	3% аргинина	0,02% PS80	
		3B	2% Сахарозы	2% аргинина	0,02% PS80	

Композиции оценивали путем визуального наблюдения, при помощи A350, HP–SEC (чистота), HP–IEX (профиль заряда), HP–HIC (Met–105 окисление) и CE–SDS. Никаких изменений не наблюдалось между различными композициями при хранении при 5°C в течение до 12 месяцев, независимо от того, хранились ли они в флаконах или шприцах, при визуальном наблюдении, по данным A350, HP–SEC, HP–IEX, HP–HIC и CE–SDS (NR). Поэтому все композиции считали стабильными в условиях хранения при 5°C.

Каждую из тестируемых композиций визуально проверяли на изменения окраски или образования осадка (данные не показаны). Все композиции показали некоторую степень желтого цвета при 25°C при визуальной оценке. Композиции, содержащие сахарозу без аргинина (композиции 1A и 1B), начали проявлять слегка желтый цвет через 3 месяца. К 9 месяцам во всех образцах наблюдались осадки или частицы. Композиция, содержащая 2% сахарозы и 2% аргинина, образовала гель в флаконе (композиция 3A), что было заметно в некоторых флаконах уже через 1 месяц, но не в шприце (композиция 3B). Быстрые изменения наблюдали для всех композиций при 40°C в течение 9–месячного периода тестирования. Желтую окраску наблюдали только для сахарозы (1A и 1B) через 1 месяц как в флаконе, так и в шприце.

Значения A350 измеряли как показатель мутности (данные не показаны). При 25°C в течение 6-месячного периода тестирования наблюдалась тенденция увеличения мутности для образцов, содержащих сахарозу (композиции 1А и 1В), и образцов, содержащих комбинацию сахароза-аргинин в флаконе (композиция 3А). Увеличение A350 значения для образцов с сахарозой за 6-месячный период коррелировало с наблюдением желтой окраски. Кроме того, было обнаружено, что A350 образцов с сахарозой-аргинином атипично выше, чем образцов, содержащих такую же комбинацию в шприце. При 40°C наблюдали более выраженную тенденцию увеличения мутности с течением времени. Образцы, содержащие сахарозу (композиции 1А и 1В), стали янтарными и, следовательно, A350 не измеряли через 6 месяцев. Композицию с сахарозой-аргинином в флаконе (композиция 3А) также не измеряли при помощи A350 через 6 месяцев из-за образования геля. Результаты A350 для композиций, содержащих аргинин (без сахарозы, композиции 2А и 2В) как в флаконах, так и в шприцах, и композиций с сахарозой-аргинином в шприцах (композиция 3В) были сопоставимы.

Чистоту композиций определяли при помощи HP-SEC в течение 9 месяцев (данные не показаны). При 25°C тенденцию небольшого снижения % mAb, с соответствующим увеличением %HMW, наблюдали для всех 5 композиций с течением времени. Сахароза-содержащие композиции в флаконах и шприцах (композиция 1А и 1В) показали наибольшее изменение по сравнению с другими композициями. Данные % LMW указывали на значительную вариабельность в промежуточные моменты времени (3М, 6М) и не были окончательными. При 40°C тенденцию снижения % mAb, с соответствующим увеличением % HMW и % LMW, наблюдали для всех композиций в течение 9 месяцев. За время испытания не было четких различий между различными композициями.

Профиль заряда определяли при помощи HP-IEC (данные не показаны). При 25°C, тенденцию небольшого снижения % главного пика и % общего количества щелочных видов, с соответствующим увеличением % кислотных видов, наблюдали для всех 5 композиций в течение 9 месяцев. Наибольшее изменение наблюдали для сахароза-содержащих композиций (композиции 1А и 1В) в флаконах или шприцах по сравнению с аргинин-содержащими (композиции 2А и 2В) и сахароза+аргинин-содержащими композициями (композиции 3А и 3В). При 40°C наблюдали более выраженную тенденцию снижения % главного пика и % общего количества щелочных видов, с соответствующим увеличением % кислотных видов. Не было четких различий между различными композициями через 3 месяца. Кроме того, не было четких различий в профилях стабильности для композиций в флаконах по сравнению с шприцами.

Окисление Met-105 измеряли при помощи HP-NIC. Минимальные изменения в окислении Met-105 наблюдали для любой из композиций при 5°C в течение 9 месяцев (Фиг. 2А). При 25°C наблюдали тенденцию небольшого увеличения в % общего пика перед главным пиком 1+2 среди всех композиций в флаконах, что не наблюдали для соответствующих композиций в шприцах (Фиг. 2В). Более высокое увеличение окисления через 9 месяцев наблюдали для сахароза-содержащих композиций (без аргинина) в

флаконах по сравнению с композициями, содержащими аргинин (с или без сахарозы). При 40°C через 3 месяца наблюдали резкое увеличение скорости окисления для аргинин-содержащих композиций (флакон и шприц) и композиции с сахарозой в шприце (Фиг. 2С). Другие композиции не были испытаны через 3 месяца из-за образования геля или янтарной окраски (см. обсуждение выше)).

Пример 4

Оценка композиций, содержащих высокую концентрацию пембролизумаба с альтернативными снижающими вязкость агентами

Дополнительное исследование осуществляли для проверки использования альтернативных эксципиентов в качестве снижающих вязкость агентов в композициях с высокой концентрацией пембролизумаба. Серии композиций получали (Таблица 6) в микрофлаконах для ВЭЖХ с объемом заполнения 400 мкл. Композиции в этом исследовании не включали никакого антиоксиданта. Образцы помещали в камеры для исследования стабильности при температурах 5°C, 25°C и 40°C на 12 недель. Тестируемые композиции для этого исследования не содержали никакого антиоксиданта.

Таблица 6

Композиции с высокой концентрацией пембролизумаба для Примера 4

Композиция	Антитело	Буфер	Стабилизатор 1	Стабилизатор 2	Поверхностно-активное вещество
1	200 мг/мл пембролизумаба	10 mM Гистидина pH 5,5	2% Гистидина	–	0,02% PS80
2			2% Гистидина	2% аргинина	0,02% PS80
3			2% Гистидина	2% Сахарозы	0,02% PS80
4			150 mM камфорсульфоновой кислоты	–	0,02% PS80
5			150 mM Гуанидина гидрохлорида	–	0,02% PS80

Никаких изменений в чистоте не наблюдали в HP-SEC анализе (измеренной как % mAb) для композиций, хранящихся при 5°C в течение 12 недель (Фиг. 3А). Для образцов, хранящихся при 25°C, среди всех пяти композиций наблюдали тенденцию, которая демонстрировала небольшое снижение % mAb, причем композиция 4 (150 mM камфорсульфоновой кислоты) показала максимальное снижение (~5%) среди 5 композиций (Фиг. 3В). Тенденцию снижения % mAb также наблюдали для композиций, хранящихся при 40°C, без четких различий между этими 5 тестируемыми композициями (Фиг. 3С).

Аналогично результатам, полученным в анализе HP-SEC, не было обнаружено различий в профиле заряда среди 5 композиций при 5°C в течение 12 недель, как оценивали при помощи HP-IEC. И снова при 25°C наблюдали тенденцию, которая демонстрировала снижение в % главного пика для всех пяти композиций в течение 12 недель, причем наиболее выраженное снижение показали композиции 3 и 4 (150 mM камфорсульфоновой кислоты и 150 mM гуанидина HCL). При 40°C более выраженное

снижение % главного пика наблюдали при помощи НР-ІЕХ для каждой из пяти композиций в течение периода испытания, без четких различий между этими пятью тестируемыми композициями (данные не показаны).

Никаких различий в % окисления Met-105 (пик перед основным пиком 1+2) не наблюдали ни для одной из пяти композиций через 12 недель в условиях хранения при 5°C, как измерено при помощи НР-НІС (Фиг. 4А). Однако, для композиции 4, наблюдали увеличение % пика перед главным пиком (отличного от пика перед главным пиком 1+2) (данные не показаны). Пики перед главным пиком, отличные от 1+2, содержат вклады молекул, в которых оба метиониновых остатка на молекулу окислены. Небольшое увеличение % общего пика перед главным пиком 1+2, указывающее на окисленные виды, наблюдали для композиций 3 (2% гистидина, 2% сахарозы) и 4 (150 мМ камфорсульфоновой кислоты) при 25°C (Фиг. 4В), а также увеличение % пика перед главным пиком для пиков, отличных от 1+2 (данные не показаны). Минимальные изменения % общего пика перед главным пиком 1+2 обнаружены для композиций 1, 2 и 5 (Фиг. 4В). Однако композиция 1 и композиция 2 не показали значительное увеличение % пиков перед главным пиком, отличных от 1+2 (данные не показаны).

Более выраженное увеличение наблюдали в % общего пика перед главным пиком 1+2 среди всех 5 композиций в условиях хранения при 40°C в течение 12 недель, при этом композиции 3 и 4 снова показали наибольшие изменения % общего пика перед главным пиком 1+2 (Фиг. 4С) и % пиков перед главным пиком, отличных от 1 +2 (данные не показаны). Композиции 1, 2 и 5 демонстрировали наименьшие изменения % пика перед главным пиком 1+2 (Фиг. 4С), но наблюдали значительные изменения % пиков перед главным пиком, отличных от 1+2, указывающие на окисление обоих Met-105 остатков (данные не показаны).

Пример 5

Анализ композиций, содержащих аргинин в комбинации с глутамином

Предыдущие исследования показали, что эквимольная смесь аргинина и глутамин может подавлять индуцируемую температурой агрегацию моноклональных антител в биологических композициях (Kheddo et al., *Int. J. Pharmaceutics* 473: 126–33(2014)). Fukuda et al. (*Pharm. Res.* 31:992–1001 (2014)) показали, что Arg-HCl может подавлять агрегацию антител при почти нейтральном pH, но способствует агрегации и разложению при кислотном pH или высоких температурах. В этом исследовании влияние Arg-HCl при высокой температуре можно смягчить, добавив эквимольную смесь аргинина и аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты, что приводило к подавлению агрегации (Fukuda et al.).

Чтобы исследовать влияние эквимольной смеси глутамин и аргинина на композиции пембролизумаба, был составлен и испытан ряд композиций, как описано ниже. Концентрированное лекарственное вещество пембролизумаб получали в концентрации 252,3 мг/мл в 10 мМ гистидина, pH 5,5 путем концентрирования и диафильтрации. Композиции C1–C6 получали путем введения в исходных растворов

следующих эксципиентов: L-аргинин гидрохлорида (475 мМ исходный раствор), L-глутаминовой кислоты (170 мМ исходный раствор), Полисорбата–80 (2% масс/масс исходный раствор) и сахарозы (40% масс/об исходный раствор) в лекарственное вещество пембролизумаб для получения целевых композиций, перечисленных в Таблице 7. Сформулированные партии лекарственного вещества фильтровали с использованием шприцевого фильтра PVDF 0,22 мкм и загружали в 2-мл стеклянные флаконы (объем наполнения: 0,5 мл). Флаконы закрывали крышками с использованием 13 мм резиновых медицинских пробок и герметизировали с помощью 13 мм отрывных колпачков. Флаконы инкубировали в инкубаторе комнатного типа при 40°C с 75% относительной влажностью (RH). Флаконы тестировали в моменты времени T0, 1 неделя, 2 недели, 4 недели и 8 недель.

Термическое разворачивание тестировали при помощи DSC (Таблица 7) и измеряли вязкость каждой композиции (Таблица 7). Результаты показывают, что не наблюдали улучшения поведения термического разворачивания в присутствии эквимоллярной смеси Arg и Glu. Снижение вязкости наблюдали для всех композиций, содержащих Arg, Glu или Arg: Glu (1:1) по сравнению с C1, которая не содержала аргинин или глутамин (Таблица 7). Количество агрегации каждой из этих композиций в течение 12-недельного периода хранения при 40°C также измеряли при помощи HP-SEC. Результаты указывают на отсутствие снижения агрегации для композиций, содержащих эквимоллярную смесь Arg:Glu (Фиг. 5).

Таблица 7

Композиции с высокой концентрацией пембролизумаба для Примера 5

№	Композиция	DSC (термическое разворачивание)			Вязкость (сПз)
		Tonset	Tm1	Tm2	
C1	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5	63,9	66,9	78,2	21,9
C2	C1+35 мМ Аргинина	64,2	64,5	76,8	18,2
C3	167 мг/мл пембролизумаба, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5+40 мМ Arg+40 мМ Glu	62,3	64,7	75,9	16,0
C4	167 мг/мл пембролизумаба, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5+20 мМ Arg+20 мМ Glu	61,8	65,2	76,0	16,8
C5	167 мг/мл пембролизумаба, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5+40 мМ Arg	61,8	64,7	76,0	15,5
C6	167 мг/мл пембролизумаба, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5+40 мМ Glu	62,8	64,8	75,8	17,9

Пример 6

Влияние антиоксидантов и хелаторов на стабильность в присутствии ионов металлов

Исследование 1:

Ионы металлов можно вводить в процессе получения биологических композиций, например из стальных резервуаров, обычно используемых для обработки продуктов моноклональных антител и соответствующих буферов. Чтобы определить влияние антиоксидантов и хелаторов на стабильность композиции в присутствии ионов металлов, серии тестируемых композиций оценивали при помощи HP-SEC (Таблица 8). Концентрированное лекарственное вещество пембролизумаб получали в концентрации 252,3 мг/мл в 10 mM гистидина, pH 5,5 путем концентрирования и диафильтрации. Композиции D1–D5 получали путем впрыскивания исходных растворов следующих эксципиентов: метионина (100 mM исходный раствор), хлорида железа (0,0227% масс/об исходный раствор), полисорбата–80 (2% масс/масс исходный раствор) и сахарозы (40% масс/об исходный раствор) в лекарственное вещество пембролизумаб для получения целевых композиций, перечисленных в Таблице 8.

Сформулированные партии лекарственного вещества фильтровали с использованием 0,22 шприцевого фильтра PVDF 0,22 мкм и загружали в 2-мл стеклянные флаконы (объем наполнения: 0,5 мл). Флаконы закрывали крышками с использованием 13 мм резиновых медицинских пробок и герметизировали с помощью 13 мм отрывных колпачков. Флаконы инкубировали в инкубаторе комнатного типа при 40°C/75% RH. Флаконы тестировали в моменты времени T0, 1 неделя, 2 недели, 4 недели и 8 недель.

Базовая композиция, протестированная в этом исследовании, (Композиция 1) содержала высокую концентрацию пембролизумаба с сахарозой и PS80 в гистидиновом буфере (см. Таблицу 8, № D1), в то время как Композиция D3 содержала базовую композицию+ионы металлов с антиоксидантом (метионин), а Композиция D5 содержала базовую композицию+ионы металлов и хелатор (DTPA).

Таблица 8

Композиции, используемые в Примере 6, Исследование 1

	Композиция	% Агрегатов (HP-SEC)				
		ТТ0	1 неделя	2 недели	4 недели	8 недель
DD1	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10 mM Гистидинового буфера, pH 5,5	00,8	11,1	11,4	22,1	33,1
DD2	D1+1mM Метионина	00,8	11,1	11,4	22,1	33,1
DD3	D1+1ч/млн Fe ⁺⁺ , 1mM Метионина	00,8	11,3	11,6	22,5	44,0
DD4	D1+1ч/млн Fe ⁺⁺	00,8	11,3	11,7	22,5	44,2
DD5	D1+1ч/млн Fe ⁺⁺ , 100мкM DTPA	00,8	11,1	11,5	22,2	33,2

Результаты показали, что метионин не предотвращал агрегацию в присутствии

ионов металлов (Таблица 8, Композиция D3). В композиции, содержащей DTPA в присутствии ионов металлов (Композиция D5), наблюдали снижение % агрегатов по сравнению с базовой композицией в присутствии ионов металлов без хелатора/антиоксиданта (Композиция D4) или с композицией с метионином (Композиция D3) в присутствии ионов металлов через 8 недель.

Композиции также оценивали при 40°C через 8 недель при помощи HP–HIC для определения влияния метионина и DTPA на окисление в присутствии ионов металлов (данные не показаны). Небольшое снижение окисления наблюдали в композиции, содержащей метионин, и композиции, содержащей DTPA в присутствии Fe^{2+} , относительно контролей.

Исследование 2:

Влияние дополнительных антиоксидантов и хелаторов (Композиции E1–E9, Таблица 9) на стабильность и окисление в присутствии ионов металлов при 40°C оценивали при помощи HP–SEC и HP–HIC.

Таблица 9

Композиции, используемые в Примере 6, Исследование 2

		% Агрегатов (HP–SEC)				
		T0	1 неделя	2 недели	4 недели	8 недель
	Базовая композиция (D1)*	00,8	11,1	11,4	22,1	33,1
E1	D1+5мМ Метионина	1,0	1,3	1,6	2,1	2,4
E2	D1+10мМ Метионина	0,9	1,3	1,5	2,1	2,4
E3	D1+1ч/млн Fe^{++} , 10мМ Метионина	1,0	1,4	1,7	2,4	2,9
E6	D1+1ч/млн Fe^{++} , 250мкМ EDTA	1,0	1,4	1,7	2,5	3,1
E7	D1+1ч/млн Fe^{++} , 250мкМ DTPA	1,0	1,4	1,7	2,3	2,6
E8	D1+1ч/млн Fe^{++} , 20мМ цитрат натрия	1,0	1,5	1,9	2,5	2,8
E9	D1+1ч/млн Fe^{++} , 5мМ Глутатиона	0,8	2,4	3,3	4,6	5,0

*Представленные данные взяты из исследования, представленного в Таблице 8.

HP–SEC результаты (см. Таблица 9) показывают, что композиции, содержащие 5мМ и 10 мМ метионина (Композиции E1 и E2), демонстрировали небольшое увеличение агрегатов без ионов металлов. Композиции, содержащие метионин и DTPA (Композиции E3 и E7), демонстрировали более низкое увеличение уровней агрегатов в присутствии ионов металлов по сравнению с EDTA (Композиция E6). Самое большое увеличение агрегатов наблюдали в композиции, содержащей глутатион в присутствии ионов металлов (Композиция E9).

Окисление композиций при 40°C также тестировали в течение 8–недель при

помощи HP–HIC (см. Фиг. 6). Снижение уровней окисления в течение 8–недель наблюдали при помощи анализа HP–HIC для композиций, содержащих 5 мМ и 10 мМ метионина (Композиции E1 и E2), по сравнению с другими тестируемыми композициями. Композиции, содержащие 10 мМ метионина (Композиция E3) и 250 мкМ DTPA (Композиция E6), демонстрировали низкий уровень окисления в течение 8–недель в присутствии ионов металлов. Результаты также показывают, что DTPA был более эффективным, чем EDTA, в предотвращении окисления с течением времени. Цитрат натрия и глутатион, по–видимому, не столь эффективны для контроля окисления в присутствии ионов металлов, как метионин, DTPA или EDTA.

Исследование 3:

Было проведено дополнительное исследование для оценки влияния антиоксидантов и хелаторов по отдельности и в комбинации (с ионами металлов или без них) для дальнейшей оптимизации уровней эксципиентов. После формулирования образцы хранили при 40°C в течение 8 недель и оценивали при помощи HP–SEC при T=0, 4 недели и 8 недель (см. Таблицу 10).

Таблица 10

HMW (SEC) для композиций, используемых в Примере 6, Исследование 3

	Композиция	T=0	4 недели/ 40°C	8 недель/ 40°C
H1	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS–80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5	1,01	2,01	2,81
H2	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS–80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 100 мкМ DTPA	1,01	2,07	2,84
H3	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS–80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 1ч/млн Fe ⁺⁺ , 100 мкМ DTPA	1,01	2,10	2,88
H4	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS–80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 100 мкМ EDTA	0,90	1,63	2,18
H5	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS–80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 1ч/млн Fe ⁺⁺ , 100 мкМ EDTA	0,92	1,98	3,13
H6	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS–80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 10 мМ Метионина, 100мкМ DTPA	1,00	2,07	2,80
H7	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS–80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 1ч/млн Fe ⁺⁺ , 10 мМ Метионина, 100uM DTPA	0,99	2,07	2,81

H8	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 10 мМ Метионина, 100мкМ EDTA	0,91	1,65	2,17
H9	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 1ч/млн Fe ⁺⁺ , 10 мМ Метионина, 100мкМ EDTA	0,91	1,83	2,67
H10	167 мг/мл пембролизумаба, 3% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 40мМ Arg, 40 мМ Glu	0,89	1,57	2,06
H11	167 мг/мл пембролизумаба, 3% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 10 мМ Метионина, 40мМ Arg, 40 мМ Glu, 100 мкМ DTPA	0,89	1,68	2,12
H12	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 10 мМ Метионина	1,06	1,99	2,70
H13	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5, 10 мМ Метионина	1,06	2,00	2,70
H14	167 мг/мл пембролизумаба, 7% Сахарозы, 0,02% PS-80, 10мМ Гистидинового буфера, pH 5,5	1,06	2,05	2,79

В этом исследовании присутствие аргинина и глутамата (композиции H10 и H11) очевидно имело влияние на скорость агрегации.

Окисление вышеуказанных образцов при 40°C также измеряли при помощи HP-NIS в течение 8 недель. Результаты указывают, что присутствие 10 мМ метионина привело к снижению скорости агрегации в течение 8-недель по сравнению с другими композициями (см. Фиг. 7).

В целом, исследования 1–3 продемонстрировали, что присутствие L-метионина в композициях пембролизумаба способно снижать скорость окисления в зависимости от концентрации. Никакого дополнительного преимущества от добавления DTPA и EDTA вместе с метионином не наблюдали.

Пример 7

Вязкость композиций с высокой концентрацией анти-PD-1 антител

Исследование 1 – Вязкость как функция концентрации белка

Исследование 1A:

В одном эксперименте измеряли вязкость несформулированного пембролизумаба (пембролизумаб в 10 мМ гистидинового буфера) как функцию концентрации белка. Образцы получали путем ультрафильтрации/диафильтрации пембролизумаба в 10 мМ

гистидинового буфера pH 5,4. Значения концентрации измеряли при помощи SoloVPE, а вязкость измеряли с использованием устройства MVROC. Значения представлены в Таблице 11 ниже.

Таблица 11

Вязкость несформулированного пембролизумаба (в 10 mM гистидинового буфера pH 5,5) как функция концентрации белка

Измеренная концентрация пембролизумаба (мг/мл)	Вязкость при 20°C (сПз)
25	1,3
46	1,7
54,7	1,8
90,2	3,1
135,6	7,6
153,8	11,3
206	52,3
223,4	88,1
234	173,4
263	425

Исследование 1В:

В другом эксперименте также измеряли вязкость пембролизумаба, сформулированного в 10 mM гистидина pH 5,5, в присутствии 3% (масс/об) аргинина как функцию концентрации пембролизумаба. Образцы для этого эксперимента получали путем ультрафильтрации–диафильтрации пембролизумаба в 10 mM гистидинового буфера pH 5,4 в присутствии 3% (масс/об) аргинина. Образцы собирали на различных стадиях UV/DF процесса и измеряли значения концентрации и вязкости. Значения концентрации измеряли при помощи SoloVPE, и вязкость измеряли с использованием устройства MVROC. Значения представлены в Таблице 12.

Таблица 12

Вязкость пембролизумаба, формулированного в 10 mM гистидина pH 5,5, в присутствии 3% (масс/об) аргинина

Измеренная концентрация пембролизумаба (мг/мл)	Вязкость при 20°C (сПз)
51,6	1,8
93,1	3,0
157,3	9,90
217,3	50,9
288	271,0

Исследование 1С:

В другом эксперименте измеряли вязкость формулированных образцов пембролизумаба. Композиции пембролизумаба получали при различных концентрациях в диапазоне 100–200 мг/мл с 7% (масс/об) сахарозы, 0,02% (масс/об) полисорбата 80, 10 mM Метионина в 10 mM гистидинового буфера pH 5,5. Композиции получали смешиванием следующих исходных растворов: (1) лекарственное вещество пембролизумаб при 236 мг/мл в 10 mM гистидинового буфера pH 5,5; (2) 49% (масс/масс) сахарозы, 0,14%

(масс/масс) полисорбата 80, 85 мМ метионина в 10 мМ гистидина pH 5,4; и (3) 10 мМ гистидина pH 5,5. Измерения вязкости выполняли с использованием вискозиметра MVROC (см. Таблицу 13).

Таблица 13

Вязкость полностью формулированного пембролизумаба как функция концентрации белка

Измеренная концентрация ¹ (мг/мл)	Вязкость ² при 20°C, (сПз)
100,2 (0,2)	4,2 (0,0)
125,6 (0,2)	7,1 (0,1)
148,1 (0,6)	13,1 (0,0)
174,8 (0,2)	26,8 (0,1)
186,1 (1,2)	34,7 (0,4)
204,1 (1,3)	54,9 (0,5)

¹ Значения концентрации образцов измеряли в трех повторах методом УФ-абсорбции A280 разбавленных образцов и представляли как среднее значение со стандартным отклонением.

² Значения вязкости измеряли в трех повторах и представляли как среднее значение со стандартным отклонением.

Исследование 2: Эффект различных эксципиентов на вязкость растворов с высокой концентрацией пембролизумаба

В этом исследовании получали исходные растворы различных эксципиентов в 10 мМ гистидинового буфера pH 5,5. Далее, образцы лекарственного вещества пембролизумаба в 10 мМ гистидина, pH 5,5, вводили с этими исходными растворами эксципиентов для достижения целевой концентрации эксципиента. Значения концентрации пембролизумаба измеряли при помощи SoloVPE и вязкость измеряли с использованием устройства MVROC (Таблица 14). Также измеряли pH образца.

Таблица 14

Эффект различных эксципиентов на вязкость растворов пембролизумаба в 10 мМ гистидина pH 5,5 (целевой pH)

Эксципиент	Целевая концентрация эксципиента (единица)	Измеренная концентрация пембролизумаба (мг/мл)	Измеренный pH ¹	Вязкость ² (сПз) при 20°C
L-аргинин	200 мМ	183	5,5	20,29
Поли-аргинин (5–15 кДа)	0,5 мг/мл	202	5,6	51,354
Поли-аргинин (15–70 кДа)	0,5 мг/мл	186	5,56	54,018
L-аланин	200 мМ	197	5,47	30,641
L-цистеин	200 мМ	187	5,56	31,844
L-глутамин	60 мМ	193	5,6	53,825
Глицин	200 мМ	175	5,52	42,769
L-гистидин	100 мМ	186	5,05	19,402
L-лизин	200 мМ	179	5,52	27,431
L-метионин	40 мМ	200	5,45	38,501
O-фосфо-L-	30 мМ	151	5,56	34,42

серин				
Хлорид калия	200 мМ	195	5,59	38,246
Хлорид натрия	200 мМ	208	5,69	58,192
Хлорид кальция	200 мМ	178	5,56	33,593
Йодид калия	200 мМ	180	5,7	34,626
Йодид натрия	200 мМ	197	5,77	35,92
Гуанидин гидрохлорид	200 мМ	189	5,61	20,984
DMSO	10% (об/об)	180	5,4	13,056
протамин	0,75 мг/мл	180	5,54	50,328
Камфор–10–сульфоновая кислота	200 мМ	191	5,64	15,698
L–Глутаминовая кислота	200 мМ	173	5,55	52,368
Полисорбат 80	0,1% (масс/об)	183	5,89	49,268
Плюроник F127	0,1% (масс/об)	179	5,85	43,908
АТФ	12,5 мг/мл	173	5,73	56,695

¹ Целевой рН всех образцов составлял 5,5; однако в некоторых случаях рН вводимого раствора влиял на рН введенных образцов пембролизумаба

² Вязкость контрольного раствора пембролизумаба только в 10 мМ гистидинового буфера (без введения эксципиентов) в этом эксперименте не измеряли; однако, исходя из других экспериментов, ожидали значение ~50 сПз

Исследование 3: Эффект концентрации аргинина, гистидина и метионина на вязкость растворов пембролизумаба

В этом исследовании изучали эффект концентрации аргинина, гистидина, ацетата натрия и метионина на вязкость растворов пембролизумаба. Лекарственное вещество пембролизумаб (>200 мг/мл) в 10 мМ гистидина рН 5,4 смешивали с различными количествами исходных растворов аргинина, гистидина и метионина для достижения различных концентраций эксципиентов в растворах, содержащих целевые концентрации пембролизумаба 200 мг/мл или 167 мг/мл. Результаты суммированы в Таблице 15.

Таблица 15

Эффект концентрации эксципиента на вязкость

		Целевая концентрация пембролизумаба – 200 мг/мл		Целевая концентрация пембролизумаба – 167 мг/мл	
		Измеренная концентрация пембролизумаба (мг/мл)	Вязкость при 20°C (сПз)	Измеренная концентрация пембролизумаба (мг/мл)	Вязкость при 20°C (сПз)
Эксципиент	0	191,6	37,847	163,4	18,512
	0 ¹	202,5	58,7	–	–
L–аргинин HCl	15	193,4	37,268	164,8	17,427
	30	188,2	32,976	163,6	16,206
	45	196,4	30,041	166,3	17,950

	60	191,2	28,615	161,8	12,951
	75	190,7	26,697	168,7	13,758
	71 ¹	193,3	27,1	—	—
	142 ¹	201,8	26,1	—	—
	213,6 ¹	203,5	26,7	—	—
	285 ¹	205,7	26,8	—	—
	356 ¹	211,7	25,6	—	—
	427 ¹	205,5	25,3	—	—
L– Гистидин Гидрохлорид моногидрат	5	183,6	37,142	165,1	18,209
	20	189,8	20,356	164,2	16,654
	35	190,1	30,337	166,4	16,877
	50	193,9	24,073	168,9	15,490
	65	190,2	27,341	166	13,303
L– метионин	10	190,8	45,544	168,7	19,708
	20	188	46,901	160,8	19,926
	30	191,7	45,374	161,2	18,402
	40	194,3	41,235	161,3	18,304

¹Значение представляет данные отдельного эксперимента, в котором оценивали концентрации аргинин.HCl до 9% (масс/об) (эквивалентно 427 мМ)

Данные вышеприведенных исследований демонстрируют, что вязкость пембролизумаба в 10 мМ гистидинового буфера pH 5,5 экспоненциально увеличивается с увеличением концентрации белка (таблица 11). Данные также показывают, что присутствие 3% (масс/об) аргинина снижает вязкость пембролизумаба в 10 мМ растворе гистидина pH 5,5; однако, все еще наблюдается экспоненциальное увеличение вязкости с увеличением концентрации пембролизумаба (Таблица 12). Значения вязкости пембролизумаба, формулированного в 10 мМ гистидина pH 5,5, вместе с 7% (масс/об) сахарозы, 0,02% полисорбата 80, 10 мМ метионина, в диапазоне концентрации белка 100–200 мг/мл аналогичны соответствующим значениям, измеренным в 10 мМ буфере pH 5,5 только. Вязкость формулированного пембролизумаба показывает значительное увеличение приблизительно 150 мг/мл и более высокие концентрации (Таблица 13).

Различные эксципиенты оказывали влияние на вязкость растворов с высокой концентрацией пембролизумаба в различной степени (Таблица 14). Эксципиенты, которые имели самое большое влияние на вязкость пембролизумаба, включают L–аргинин, L–гистидин, гуанидин гидрохлорид, DMSO и камфорсульфоновую кислоту (Таблица 14). Помимо этого, Таблица 15 показывает, что L–аргинин и L–гистидин снижают вязкость раствора пембролизумаба зависимым от концентрации образом и что добавление L–метионина до 40 мМ не снижает вязкость пембролизумаба.

Пример 8

Долгосрочная стабильность композиций с высокой концентрацией анти-PD-1 антител

Дополнительные исследования выполняли для определения долгосрочной стабильности композиций с высокой концентрацией пембролизумаба в присутствии и в

отсутствие метионина. Это исследование изучало влияние концентрации и присутствия антиоксиданта (например, метионина) на стабильность пембролизумаба. Исходные растворы эксципиентов получали и вводили в лекарственное вещество пембролизумаб для получения конечной композиции, представленной в Таблице 16. Композиции распределяли в камеры для исследования стабильности при температурах 5°C +/- 3°C, 25°C +/- 3°C/ с относительной влажностью 60% ± 5% и 40°C +/- 2°C/ с относительной влажностью 75% ± 5%. Композиции K2 и K3 распределяли по ограниченной стабильности по сравнению с композициями K1 и K4. Запланированная продолжительность исследования составляла 36 месяцев, при этом исследование при 25°C завершалось через шесть месяцев, а при 40°C завершалось через три месяца. Результаты за 12 месяцев представлены ниже.

Таблица 16

Долгосрочная стабильность композиций, содержащих пембролизумаб

Композиция	Концентрация Ab (мг/мл)		Композиция	Наполнение	Контейнер/закрытие
	Целевая	Фактическая			
K1	167	143	10 mM	1,4 мл (этикетка)	2R флакон 12 mM пробка резиновая медицинская
K2	184	161	гистидина pH 5,5, 7%		
K3	150	131	сахарозы, 0,02% PS80+10mM Met		
K4	167	146	10 mM гистидина pH 5,5, 7% сахарозы, 0,02% PS80		

Все тестируемые композиции были проверены визуально и было обнаружено, что они практически не содержат видимых частиц вплоть до 12 месяцев при 5°C. Композиции также оценивали при помощи HP-SEC, HP-NIC и HP-IEC, и результаты представлены в Таблицах 17–19 и суммированы ниже:

pH:

Все композиции имели одинаковое начальное значение pH 5,7. Никаких изменений pH не наблюдалось ни для одной из композиций при любых условиях хранения.

Эффективность в анализе связывания ELISA:

Никаких изменений в эффективности не наблюдали в анализе связывании ELISA для любой из композиций, независимо от продолжительности и состояния хранения. Все значения эффективности были в пределах приемлемых критериев 60–140% от референсных значений (значения варьировались от 85–106 в течение 12-месячного периода хранения для образцов, хранившихся при 5°C, данные не показаны).

Восстанавливающие и невосстанавливающие условия CE-SDS:

Чистоту измеряли методом CE-SDS в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Не было никакого измеримого изменения в % чистоты или % интактного IgG

как функции времени при 5°C вплоть до 12 месяцев для любой из композиций. При 5°C % чистоты в восстанавливающих условиях CE–SDS (тяжелая цепь и легкая цепь) составлял >96,5% для композиций K1 и K4 через 12 месяцев и $\geq 97,0\%$ для композиций K2 и K3 в течение аналогичного периода. При 25°C наблюдали небольшое снижение чистоты для всех композиций. При 40°C ожидаемое снижение чистоты наблюдали через 3 месяца для всех композиций. % Чистоты при 5°C при невосстанавливающих условиях CE–SDS (интактный IgG) составлял $\geq 98,2$ для композиций K1 и K2, $\geq 97,1$ для композиции K2 и $\geq 97,2$ для композиции K4 на протяжении 12 месяцев в точках времени, когда осуществляли оценку. Все результаты были в пределах клинических критериев приемлемости $\geq 90,0\%$ как для восстанавливающих, так и невосстанавливающих условий CE–SDS.

Чистота по HP–SEC:

При рекомендуемых условиях хранения при 5°C не было обнаружено заметных изменений в % HMW для любой из композиций вплоть до 12 месяцев от начальных уровней. При 25°C в течение 6 месяцев % HMW увеличивался, с соответствующим уменьшением мономера. Ни один вид LMW не мог быть обнаружен ни при одном из условий хранения для любой из композиций. При 40°C в течение 3 месяцев % HMW увеличивался для различных композиций с соответствующим уменьшением мономера. Для композиций K1–K3, увеличение HMW наблюдали с увеличением концентрации. LMW вид наблюдали для всех композиций при 40°C в точке времени 3 месяца.

Окисление по данным HP–HIC:

Окисление по Метионину 105 определяли количественно путем мониторинга пика перед главным пиком 1+2 методом HP–HIC. Композиции K1–K4 не показали изменений окисления при 5°C в течение 12 месяцев. При 25°C в течение 6 месяцев уровни пика перед главным пиком 1+2 слегка возрастали, тогда как при температуре 40°C в течение 3 месяцев увеличение было более явным. При 25°C и 40°C изменение окисления было более выраженным для композиции K4. Поскольку K4 является единственной композицией, которая не содержит L–метионин, эти результаты демонстрируют, что включение L–метионина приводило к значительному снижению скорости окисления.

Гетерогенность заряда по данным HP–IEC:

Гетерогенность заряда оценивали путем мониторинга главного пика вместе с различными кислотными и щелочными видами. При температуре 5°C вплоть до 12 месяцев не было обнаружено никаких измеримых изменений ни в одном из отдельных пиков, включая главный пик, для любой из композиций. При 25°C в течение 6 месяцев главный пик уменьшился. Наблюдали увеличение всех кислотных видов (кислотные варианты, кислотный 1 и пик перед главным пиком) и пика щелочных вариантов. Наблюдали снижение видов Щелочного 1 и Щелочного 2. При 40°C в течение 3 месяцев главный пик демонстрировал еще более крутое снижение. Подобно 25°C, увеличение наблюдали для кислотных вариантов, Кислотного 1, пика перед главным пиком и пика щелочных вариантов и снижение наблюдали в пиках Щелочно 1 и Щелочно 2.

Мутность:

Мутность партий продукта лекарственного средства определяли по стабильности путем измерения оптической плотности при 350 нм. Не было заметных изменений мутности при 5°C для любой из композиций. Образцы, которые хранили при 25°C, показали небольшое увеличение, тогда как те, которые хранили при 40°C, демонстрировали еще большее увеличение мутности. Увеличение мутности при 25°C и 40°C согласуется с увеличением количества высокомолекулярных частиц, наблюдаемых в испытании на стабильность.

В целом, основываясь на данных стабильности за двенадцать месяцев, композиции K1–K4 были стабильными при 5°C в течение вплоть до 12 месяцев без каких-либо ощутимых изменений в характеристиках качества продукта. Некоторая деградация наблюдалась при мониторинге признаков при 25°C в течение 6 месяцев и при 40°C в течение 3 месяцев. Стабильность продуктов при 5°C будет дополнительно оценена в течение вплоть до 36 месяцев.

Таблица 17

Данные стабильности для композиций K1–K4 при 5°C

Испытание	Комп.	Испытание на стабильность, время					
Временной интервал		Начальн.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.
Чистота по данным HP-SEC							
Высокомолекулярные соединения (%)	K1	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4	1,4
	K2	1,5	N.A.	N.A.	1,5	N.A.	1,5
	K3	1,5	N.A.	N.A.	1,4	N.A.	1,4
	K4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5
% мономера	K1	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5
	K2	98,5	N.A.	N.A.	98,5	N.A.	98,5
	K3	98,5	N.A.	N.A.	98,6	N.A.	98,5
	K4	98,5	98,5	98,4	98,5	98,5	98,5
Низкомолекулярные соединения (%)	K1	0	0	0	<RL ¹	<RL ¹	<RL ¹
	K2	0	N.A.	N.A.	<RL ¹	N.A.	<RL ¹
	K3	0	N.A.	N.A.	<RL ¹	N.A.	<RL ¹
	K4	0	0	0	<RL ¹	<RL ¹	<RL ¹
Окисление по данным HP-HIC							
Пик перед главным пиком 1 & 2 (%)	K1	6,26	6,34	6,50	6,35	6,05	5,73
	K2	6,28	N.A.	N.A.	6,38	N.A.	5,75
	K3	6,40	N.A.	N.A.	6,36	N.A.	5,78
	K4	6,36	6,58	6,86	6,64	6,31	6,15
Варианты заряда групп по данным HP-IEH HP-IEH							
Кислотные варианты (%)	K1	16,8	16,8	17,4	17,3	17,2	17,5
	K2	16,8	N.A.	N.A.	17,3	N.A.	17,5
	K3	16,9	N.A.	N.A.	17,4	N.A.	17,4
	K4	16,8	16,9	17,6	17,3	17,3	17,5
Главный пик (%)	K1	59,5	59,4	59,2	59,4	59,6	58,7
	K2	59,5	N.A.	N.A.	59,4	N.A.	58,7
	K3	59,5	N.A.	N.A.	59,4	N.A.	58,8
	K4	59,5	59,4	59,1	59,6	59,5	58,6
Щелочные	K1	23,8	23,8	23,4	23,3	23,2	23,7

варианты (%)	K2	23,7	N.A.	N.A.	23,3	N.A.	23,8
	K3	23,7	N.A.	N.A.	23,2	N.A.	23,8
	K4	23,7	23,7	23,3	23,1	23,2	23,8
Мутность (A350)	K1	0,187	0,185	0,190	0,189	0,192	0,200
	K2	0,200	N.A.	N.A.	0,207	N.A.	0,213
	K3	0,174	N.A.	N.A.	0,183	N.A.	0,191
	K4	0,189	0,187	0,193	0,190	0,191	0,202

¹<RL: Ниже предела отчетности

Таблица 18

Данные стабильности для композиций K1–K4 при 25°C

	Испытание	Комп.	Испытание на стабильность, время			
Временной интервал			Начальн.	1 месяц	3 месяца	6 месяцев
Чистота по данным НР–SEC	Высокомолекулярные соединения (%)	K1	1,4	1,5	1,7	1,8
		K2	1,5	N.A.	1,8	1,9
		K3	1,5	N.A.	1,7	1,8
		K4	1,5	1,6	1,8	1,9
	% мономера	K1	98,5	98,5	98,2	98,1
		K2	98,5	N.A.	98,2	98,1
		K3	98,5	N.A.	98,3	98,2
		K4	98,5	98,4	98,1	98,0
	Низкомолекулярные соединения (%)	K1	0	0	0	<RL ¹
		K2	0	N.A.	0	<RL ¹
		K3	0	N.A.	0	<RL ¹
		K4	0	0	0	<RL ¹
Окисление по данным НР–HIC	Пик перед главным пиком 1 & 2 (%)	K1	6,26	6,43	6,86	7,15
		K2	6,28	N.A.	6,88	7,15
		K3	6,4	N.A.	7,06	7,12
		K4	6,36	7,08	8,04	8,74
Варианты заряда групп по данным НР–IEХ НР–IEХ	Кислотные варианты (%)	K1	16,8	18,5	24,3	30,8
		K2	16,8	N.A.	23,7	30,8
		K3	16,9	N.A.	23,8	30,8
		K4	16,8	18,6	23,6	30,9
	Главный пик (%)	K1	59,5	58,7	54,7	50,3
		K2	59,5	N.A.	55,4	50,3
		K3	59,5	N.A.	55,3	50,3
		K4	59,5	58,4	55,6	50,2
	Щелочные варианты (%)	K1	23,8	22,9	21,0	18,9
		K2	23,7	N.A.	20,8	18,9
		K3	23,7	N.A.	20,9	18,9
		K4	23,7	23,0	20,8	18,9
Мутность (A350)		K1	0,187	0,197	0,217	0,231
		K2	0,200	N.A.	0,233	0,242
		K3	0,174	N.A.	0,200	0,212
		K4	0,189	0,199	0,219	0,244

¹<RL: Ниже предела отчетности, N.A.: не установлено

Таблица 19

Данные стабильности для композиций K1–K4 при 40°C

	Испытание	Комп.	Испытание на стабильность, время
--	-----------	-------	----------------------------------

Временной интервал			Начальн.	1 месяц	3 месяца
Чистота по данным НР–SEC	Высокомолекулярные соединения (%)	K1	1,4	2,5	4,9
		K2	1,5	N.A.	5,2
		K3	1,5	N.A.	4,6
		K4	1,5	2,6	5,4
	% мономера	K1	98,5	97,5	94,9
		K2	98,5	N.A.	94,7
		K3	98,5	N.A.	95,2
		K4	98,5	97,4	94,5
	Низкомолекулярные соединения (%)	K1	0	0	0,2
		K2	0	N.A.	0,2
		K3	0	N.A.	0,2
		K4	0	0	0,2
Окисление по данным НР–HIC	Пик перед главным пиком 1 & 2 (%)	K1	6,26	7,32	9,28
		K2	6,28	N.A.	9,25
		K3	6,4	N.A.	9,04
		K4	6,36	8,59	12,91
Варианты заряда групп по данным НР–IEX НР–IEX	Кислотные варианты (%)	K1	16,8	32,6	58,1
		K2	16,8	N.A.	58,5
		K3	16,9	N.A.	58,5
		K4	16,8	33,1	58,4
	Главный пик (%)	K1	59,5	47,8	27,8
		K2	59,5	N.A.	27,7
		K3	59,5	N.A.	28,0
		K4	59,5	47,3	27,8
	Щелочные варианты (%)	K1	23,8	19,6	14,0
		K2	23,7	N.A.	13,8
		K3	23,7	N.A.	13,6
		K4	23,7	19,6	13,8
Мутность (A350)		K1	0,187	0,231	0,322
		K2	0,200	N.A.	0,357
		K3	0,174	N.A.	0,302
		K4	0,189	0,234	0,347

[†]<RL: Ниже предела отчетности, N.A.: не установлено

Примеры (9–13) освещают получение композиций, которые используют меньшее количество антител и эксципиентов, чем предполагалось в конечных композициях. Однако, эти композиции сохраняют молярное соотношение пембролизумаб/стабилизатор и пембролизумаб/поверхностно-активное вещество конечных предполагаемых композиций. Концентрации антиоксиданта, буфера и металлохелатора тестировали при конечных предполагаемых концентрациях. Концентрации пембролизумаба (5 мг/мл), PS80 (0,0016%) и стабилизатора (например, 1,4% сахарозы) были уменьшены в 5 раз и исследованы как суррогатные композиции для более концентрированных, конечных предполагаемых композиций. Например, Композиция 1А в Таблице 20 имеет те же молярные соотношения, что и композиция, содержащая 25 мг/мл пембролизумаба, 7% сахарозы и 0,02% PS80. Ожидают, что композиции, раскрытые в Примерах 9–12, являются репрезентативными для предполагаемых конечных композиций и что раскрытые результаты показывают, как будут вести себя конечные композиции с более высокой

концентрацией. Понятно, что некоторые параметры изучаются, например, на агрегацию может влиять снижение концентрации вследствие сниженной вероятности межмолекулярных взаимодействий; однако, чтобы компенсировать это, был применен более агрессивный режим оценки стабильности (50°C в течение 10 дней) для индукции и идентификации риска стабильности.

Концентрации антиоксиданта (например, метионина), буфера (например, гистидина) и металлохелатора (например, DTPA и EDTA) не снижались аналогично другим эксципиентам. Метионин является функциональным эксципиентом, который используется для уменьшения окисления Met-105 путем удаления окислителей (таких как растворенный кислород), таким образом поддерживая химическую стабильность пембролизумаба. Аналогичным образом, DTPA является функциональным эксципиентом, который используют для образования комплексных примесей ионов металлов, которые в противном случае могут вызвать нежелательное разложение белка. Поскольку более сложно поддерживать химическую стабильность при более низких концентрациях пембролизумаба, концентрации метионина и DTPA поддерживали постоянными при 10 мМ и 20 мкМ, соответственно. Ожидают, что, если определенное количество метионина будет эффективным в композициях с низкой концентрацией, оно, скорее всего, будет столь же эффективным для предотвращения окисления в композициях с более высокой концентрацией. Ожидают, что L-гистидин и/или L-гистидин гидрохлорид при 10 мМ сохранит буферную способность при целевом pH тестируемых композиций.

Пример 9

Оценка стабильности композиций с низкой концентрацией пембролизумаба в комбинации с метионином

Начальное исследование композиции осуществляли для оценки стабильности композиций, содержащих низкую (5 мг/мл) концентрацию пембролизумаба, и для оценки влияния различных эксципиентов композиций. В Примерах 9–12, используемый аргинин представлял собой L-аргинин или L-аргинин·HCl, используемый глицин представлял собой глицин, и используемый пролин представлял собой L-пролин.

Лекарственное вещество рембролизумаб в 10 мМ Гистидина pH 5,5 (41,2 мг/мл) объединяли с раствором полисорбата-80 (PS80) (~0,36 мг/мл), затем QS до конечного объема с буфером с получением исходного раствора белка (20 мг/мл)/PS80 (0,16 мг/мл) в 10мМ гистидина pH 5,5. Композиции пембролизумаба получали до целевой концентрации 5 мг/мл путем введения в исходный раствор белка/PS80 исходных растворов эксципиентов и соответствующего буфера. Все исходные растворы, используемые для композиций, перед использованием фильтровали через PES фильтры Millipore Express® PLUS Stericup® 0,22 мкМ. Тестируемые композиции, содержащие низкую концентрацию пембролизумаба, получали в 96-луночной планшете объемом 1 мл. Эксципиенты впрыскивали в исходный раствор белка/PS80 для достижения целевых уровней каждого эксципиента и доводили до конечного объема с использованием гистидинового буфера pH 5,5 (см. Таблица 20). (2-Гидроксипропил)-β-циклодекстрин (продается под торговой

маркой CAVITRON™) и (сульфобутилэфир)-β-циклодекстрин (продается под торговой маркой CAPTISOL™) обозначаются как HPBC и SBEC, соответственно. Планшет с лунками закрывали силиконовым уплотнительным матом для 96-луночных планшетов, а затем герметизировали в вакууме (2×) в мешках для защиты от влаги, чтобы минимизировать возможное испарение. Образцы размещали в камерах для исследования стабильности при 2–8°C (как он используется в описании и в примерах, термин “5°C” используется взаимозаменяемо с “2–8°C”, что означает 5°C ± 3°C (стандартное отклонение)) и 50°C.

Таблица 20

Композиции с низкой концентрацией пембролизумаба

Комп.1	Стабилизатор	Антиоксидант	Комп.1	Стабилизатор	Антиоксидант
1A	1,4% сахарозы	–	5B	0,4% глицина	10 mM Met
1B	1,4% сахарозы	10 mM Met	6A	1,4% HPBC	–
2A	0,8% маннита	–	6B	1,4% HPBC	10 mM Met
2B	0,8% маннита	10 mM Met	7A	0,8% аргинина	–
3A	1,4% трегалозы	–	7B	0,8% аргинина	10 mM Met
3B	1,4% трегалозы	10 mM Met	8A	0,8% пролина	–
4A	0,8% сорбита	–	8B	0,8% пролина	10 mM Met
4B	0,8% сорбита	10 mM Met	9A	0,8% SBEC	–
5A	0,4% глицина	–	9B	0,8% SBEC	10 mM Met

¹Все композиции содержали 5 мг/мл пембролизумаба, 10 mM Гистидинового буфера и 0,004% PS80, в дополнение к перечисленным эксципиентам.

Каждую из тестируемых композиций проверяли визуально на изменение окраски или образование осадка (данные не показаны). Дополнительно, стабильность композиций оценивали с использованием анализа на мутность (A350), UP-SEC (для оценки чистоты) и HP-IEX (профиль заряда) после 10-дневного стабильного периода. Композиции 9A и 9B, содержащие SBEC, были заметно мутными после извлечения из камеры для исследования стабильности. Напротив, композиции 6A и 6B, содержащие HPBC, не показали каких-либо видимых признаков помутнения. Композиции 9A и 9B не были дополнительно испытаны методом UP-SEC и HP-IEX, только на мутность, как показано в Таблице 21. Результаты UP-SEC показывают, что не было никаких изменений ни для одной из композиций, которые хранили при 5°C в течение 10-дневного периода времени, за исключением композиций, содержащих аргинин (с или без метионина), где наблюдали небольшое снижение % mAb по данным UP-SEC (< 0,5%). Все другие композиции считались стабильными в условиях хранения при 5°C. При 50°C, по данным UP-SEC, наблюдались более выраженные изменения (снижение % mAb) и по данным HP-IEX (снижение % главного пика и значительное увеличение % пика, предшествующего главному пику, данные не показаны) для каждой из композиций в течение периода

проведения испытания. Удивительно, но самое высокое снижение % mAb (с соответствующим увеличением % агрегатов) наблюдали при помощи UP–SEC через 10 дней с композициями 7А и 7В при 50°C по сравнению с другими композициями, хранившимися при 50°C в течение 10 дней, что свидетельствует о том, что эти композиции имеют пониженную стабильность. Результаты анализа на мутность (A350) для композиций 7А и 7В через 10 дней при 50°C подтверждали результаты UP–SEC, указывающие на снижение стабильности композиций 7А и 7В.

В литературе было показано, что циклодекстрины стабилизируют белковые композиции путем максимизации как конформационной, так и коллоидной стабильности; однако циклодекстрины были в основном изучены с белками IgG1. Механизм, посредством которого циклодекстрины придают эту стабилизацию, является предметом многочисленных дискуссий. Как показано в Таблице 21, измерения мутности и UP–SEC композиций 6А и 6В (содержащих НРВС) продемонстрировали стабильность, которая была такой же, как с другими испытанными стабилизаторами в течение 10 дней при 50°C, в отличие от других протестированных композиций циклодекстрина (9А и 9В, содержащие SBEC), которые имели высокую мутность через 10 дней при 50°C.

Не было заметных различий в профиле заряда между какими-либо из композиций (за исключением 7А/В и 9А/В, которые не тестировали) при 50°C в течение 10–дневного периода испытаний (данные не показаны). Добавление метионина (10 мМ) к тестируемым композициям оказывало незначительное влияние на предотвращение агрегации в течение всего периода тестирования.

Таблица 21

Композиции, используемые в Примере 9

Комп.	Стабилизатор	Антиоксидант	% mAb (UP–SEC)		Мутность (A350) 10 дней @ 50°C
			10 дней @ 5°C	10 дней @ 50°C	
1A	1,4% сахарозы	–	99,1	96,0	0,017
1B	1,4% сахарозы	10 мМ Met	99,1	96,1	0,015
2A	0,8% маннита	–	99,1	96,0	0,014
2B	0,8% маннита	10 мМ Met	99,1	96,1	0,015
3A	1,4% трегалозы	–	99,1	96,0	0,015
3B	1,4% трегалозы	10 мМ Met	99,1	96,1	0,017
4A	0,8% сорбита	–	99,1	95,9	0,017
4B	0,8% сорбита	10 мМ Met	99,1	96,1	0,015
5A	0,4% глицина	–	99,0	96,1	0,018
5B	0,4% глицина	10 мМ Met	99,1	96,2	0,021
6A	1,4% НРВС	–	99,1	95,7	0,019
6B	1,4% НРВС	10 мМ Met	99,1	95,8	0,015

7A	0,8% аргинина	–	98,7	60,3	0,091
7B	0,8% аргинина	10 мМ Met	98,6	65,3	0,068
8A	0,8% пролина	–	99,1	95,2	0,016
8B	0,8% пролина	10 мМ Met	99,1	95,3	0,021
9A	0,8% SBEC	–	DNT	DNT	0,134
9B	0,8% SBEC	10 мМ Met	DNT	DNT	0,134

¹Все композиции содержали 5 мг/мл пембролизумаба, 10 мМ Гистидинового буфера и 0,004% PS80, в дополнение к перечисленным эксципиентам.

Пример 10

Анализ композиций с низкой концентрацией пембролизумаба, включающих метионин в комбинации с металлохелаторами

Для исследования влияния металлохелаторов (DTPA и EDTA) на композиции с низкой концентрацией пембролизумаба, был сформулирован и протестирован ряд композиций, как описано ниже. Исходный раствор пембролизумаба (20 мг/мл)/PS80 (0,16 мг/мл) в 10мМ гистидина pH 5,5 получали как описано выше в Примере 9. Композиции 1–8 (C – F) получали в 96–луночном планшете путем введения исходных растворов следующих эксципиентов: сахарозы (5% масс/об), маннита (5% масс/об), трегалозы (5% масс/об), сорбитола (5% масс/об), глицина (5% масс/об), HPBC (5% масс/об), аргинина (5% масс/об), пролина (5% масс/об), метионина (2% масс/об), DTPA (0,01% масс/об) и EDTA (0,01% масс/об) в исходный раствор пембролизумаба/PS80 для получения целевых композиций (QS до 1 мл с гистидиновым буфером pH 5,5), перечисленных в Таблице 22. Все исходные растворы, используемые для композиций, фильтровали через PES фильтры Millipore Express® PLUS Stericup® 0,22 мкм перед использованием. Планшет с лунками закрывали силиконовым уплотнительным матом для 96–луночных планшетов, а затем герметизировали в вакууме (2×) в мешках для защиты от влаги, чтобы минимизировать возможное испарение. Образцы помещали в камеры для исследования стабильности при 5°C и 50°C на 10 дней.

Таблица 22

Композиции с низкой концентрацией пембролизумаба, включающие метионин в комбинации с DTPA и EDTA

Ко мп. 1	Стабилизатор	Антиоксидант	Металлохелатор	Комп. 1	Стабилизатор	Антиоксидант	Металлохелатор
1C	1,4% сахарозы	–	DTPA	5E	0,4% глицина	–	EDTA
1D	1,4% сахарозы	10 мМ Met	DTPA	5F	0,4% глицина	10 мМ Met	EDTA
1E	1,4% сахарозы	–	EDTA	6C	1,4% HPBC	–	DTPA
1F	1,4% сахарозы	10 мМ Met	EDTA	6D	1,4% HPBC	10 мМ Met	DTPA
2C	0,8% маннита	–	DTPA	6E	1,4% HPBC	–	EDTA

2D	0,8% маннита	10 mM Met	DTPA	6F	1,4% HPBC	10 mM Met	EDTA
2E	0,8% маннита	–	EDTA	7C	0,8% аргинина	–	DTPA
2F	0,8% маннита	10 mM Met	EDTA	7D	0,8% аргинина	10 mM Met	DTPA
3C	1,4% трегалозы	–	DTPA	7E	0,8% аргинина	–	EDTA
3D	1,4% трегалозы	10 mM Met	DTPA	7F	0,8% аргинина	10 mM Met	EDTA
3E	1,4% трегалозы	–	EDTA	8C	0,8% пролина	–	DTPA
3F	1,4% трегалозы	10 mM Met	EDTA	8D	0,8% пролина	10 mM Met	DTPA
4C	0,8% сорбита	–	DTPA	8E	0,8% пролина	–	EDTA
4D	0,8% сорбита	10 mM Met	DTPA	8F	0,8% пролина	10 mM Met	EDTA
4E	0,8% сорбита	–	EDTA	9C	0,8% SBEC	–	DTPA
4F	0,8% сорбита	10 mM Met	EDTA	9D	0,8% SBEC	10 mM Met	DTPA
5C	0,4% глицина	–	DTPA	9E	0,8% SBEC	–	EDTA
5D	0,4% глицина	10 mM Met	DTPA	9F	0,8% SBEC	10 mM Met	EDTA

¹Все композиции содержали 5 мг/мл пембролизумаба, 10 mM Гистидинового буфера и 0,004% PS80, в дополнение к перечисленным эксципиентам.

Каждую из тестируемых композиций проверяли визуально на любые изменения в окраске или образование осадка в течение 10–дневного периода испытания (данные не показаны). Подобно результатам в Примере 9, композиции, содержащие SBEC, были заметно мутными в момент извлечения из камеры для исследования стабильности через 10 дней при 50°C. Опять же, измерения мутности (данные не показаны) подтверждают снижение стабильности этих композиций по сравнению с другими протестированными композициями. В результате, композиции 9C – 9F не подвергали дальнейшим испытаниям. Для остальных композиций результаты измерений мутности и UP–SEC были очень схожи с результатами, приведенными в Таблице 21 (за исключением композиций, содержащих аргинин (7C – 7F)), что указывает на то, что добавление металлохелатора практически не влияет на стабильность в течение 10 дней при 50°C. См. Таблицу 23. И снова, композиции, содержащие аргинин (7C–7F), демонстрировали наибольшее изменение % mAb (мономер) и самые высокие показатели мутности (данные не показаны) в течение периода оценки стабильности. Несмотря на то, что композиции 7C – 7F демонстрировали очень заметную разницу в % mAb, результаты UP–SEC для 7D и 7F показали дополнительное преимущество от включения металлохелатора в комбинации с метионином для ингибирования агрегации. Комбинация метионина и EDTA (7F) привела к немного более высокому % mAb, чем комбинация метионина и DTPA (7D). Не было

заметных различий в профиле заряда между какими-либо из композиций (за исключением 7C–7F, которые не тестировали) при 50°C в течение 10-дневного периода испытаний (данные не показаны).

Таблица 23

Композиции с низкой концентрацией пембролизумаба, включающие метионин в комбинации с DTPA и EDTA

Комп.	Стабилизатор	Антиоксидант	Металло-хелатор	% mAb (UP-SEC)	
				10 д/ 5°C	10 д/ 50°C
1C	1,4% сахарозы	–	DTPA	99,1	95,9
1D	1,4% сахарозы	10 mM Met	DTPA	99,1	96,0
1E	1,4% сахарозы	–	EDTA	99,1	95,9
1F	1,4% сахарозы	10 mM Met	EDTA	99,1	96,0
2C	0,8% маннита	–	DTPA	99,1	95,9
2D	0,8% маннита	10 mM Met	DTPA	99,1	95,9
2E	0,8% маннита	–	EDTA	99,0	95,9
2F	0,8% маннита	10 mM Met	EDTA	99,1	95,9
3C	1,4% трегалозы	–	DTPA	99,1	95,8
3D	1,4% трегалозы	10 mM Met	DTPA	99,1	96,0
3E	1,4% трегалозы	–	EDTA	99,1	96,0
3F	1,4% трегалозы	10 mM Met	EDTA	99,1	96,0
4C	0,8% сорбита	–	DTPA	99,1	95,9
4D	0,8% сорбита	10 mM Met	DTPA	99,1	95,9
4E	0,8% сорбита	–	EDTA	99,1	96,0
4F	0,8% сорбита	10 mM Met	EDTA	—	—
5C	0,4% глицина	–	DTPA	99,1	95,9
5D	0,4% глицина	10 mM Met	DTPA	99,1	96,0
5E	0,4% глицина	–	EDTA	99,1	96,0
5F	0,4% глицина	10 mM Met	EDTA	99,1	96,1
6C	1,4% HPBC	–	DTPA	99,1	94,9
6D	1,4% HPBC	10 mM Met	DTPA	99,1	95,0
6E	1,4% HPBC	–	EDTA	99,1	94,9
6F	1,4% HPBC	10 mM Met	EDTA	99,1	95,0
7C	0,8% аргинина	–	DTPA	98,7	66,9
7D	0,8% аргинина	10 mM Met	DTPA	98,5	69,7

7E	0,8% аргинина	–	EDTA	98,7	66,6
7F	0,8% аргинина	10 mM Met	EDTA	98,5	70,1
8C	0,8% пролина	–	DTPA	99,1	95,1
8D	0,8% пролина	10 mM Met	DTPA	99,1	95,2
8E	0,8% пролина	–	EDTA	99,1	95,0
8F	0,8% пролина	10 mM Met	EDTA	99,1	95,0
9C	0,8% SBEC	–	DTPA	DNT ¹	
9D	0,8% SBEC	10 mM Met	DTPA		
9E	0,8% SBEC	–	EDTA		
9F	0,8% SBEC	10 mM Met	EDTA		

¹ Не тестировали

Пример 11

Оценка эффекта pH на стабильность композиций с низкой концентрацией пембролизумаба в комбинации с метионином

Дальнейшее исследование осуществляли для оценки стабильности композиций в гистидиновом буфере при различных значениях pH. В этом исследовании оценивали гистидиновые буферы при значениях pH 4,5, 6,0 и 6,4 и оценивали влияние на стабильность пембролизумаба.

Для этого исследования композиции лекарственного средства пембролизумаба получали в концентрации 5 мг/мл в 96-луночном планшете. Исходные растворы пембролизумаба (20 мг/мл)/PS80 (0,16 мг/мл) в 10мМ гистидина при pH 4,5, 6,0 и 6,4 получали из исходного раствора пембролизумаба/PS80 pH 5,5 путем доведения pH разбавленным раствором HCl или NaOH до целевого уровня pH. Исходные растворы эксципиентов доводили до целевого pH аналогичным способом и фильтровали через PES фильтры Millipore Express® PLUS Stericup® 0,22 мкм перед использованием. Следующие исходные растворы эксципиентов вводили в исходные растворы пембролизумаба (20 мг/мл)/PS80 (0,16 мг/мл) для достижения целевых концентраций, перечисленных в Таблице 24: сахароза (5% масс/об), маннит (5% масс/об), трегалоза (5% масс/об), сорбит (5% масс/об), глицин (5% масс/об), HPBC (5% масс/об), аргинин (5% масс/об), пролин (5% масс/об) и метионин (2% масс/об). Планшет с лунками закрывали силиконовым уплотнительным матом для 96-луночных планшетов, а затем герметизировали в вакууме (2×) в мешках для защиты от влаги, чтобы минимизировать возможное испарение. Образцы помещали в камеры для исследования стабильности при 5°C и 50°C на 10 дней.

Таблица 24

Композиции пембролизумаба, включающие Метионин, при различных значениях pH

Комп. 1	Стабилизатор	Анти-оксидант	pH	Комп. 1	Стабилизатор	Анти-оксидант	pH
---------	--------------	---------------	----	---------	--------------	---------------	----

1G	1,4% сахарозы	–	4,5	5G	0,4% глицина	–	4,5
1H	1,4% сахарозы	10 mM Met	4,5	5H	0,4% глицина	10 mM Met	4,5
1J	1,4% сахарозы	–	6,0	5J	0,4% глицина	–	6,0
1K	1,4% сахарозы	10 mM Met	6,0	5K	0,4% глицина	10 mM Met	6,0
1L	1,4% сахарозы	–	6,4	5L	0,4% глицина	–	6,4
1M	1,4% сахарозы	10 mM Met	6,4	5M	0,4% глицина	10 mM Met	6,4
2G	0,8% маннита	–	4,5	6G	1,4% HPBC	–	4,5
2H	0,8% маннита	10 mM Met	4,5	6H	1,4% HPBC	10 mM Met	4,5
2J	0,8% маннита	–	6,0	6J	1,4% HPBC	–	6,0
2K	0,8% маннита	10 mM Met	6,0	6K	1,4% HPBC	10 mM Met	6,0
2L	0,8% маннита	–	6,4	6L	1,4% HPBC	–	6,4
2M	0,8% маннита	10 mM Met	6,4	6M	1,4% HPBC	10 mM Met	6,4
3G	1,4% трегалозы	–	4,5	7G	0,8% аргинина	–	4,5
3H	1,4% трегалозы	10 mM Met	4,5	7H	0,8% аргинина	10 mM Met	4,5
3J	1,4% трегалозы	–	6,0	7J	0,8% аргинина	–	6,0
3K	1,4% трегалозы	10 mM Met	6,0	7K	0,8% аргинина	10 mM Met	6,0
3L	1,4% трегалозы	–	6,4	7L	0,8% аргинина	–	6,4
3M	1,4% трегалозы	10 mM Met	6,4	7M	0,8% аргинина	10 mM Met	6,4
4G	0,8% сорбита	–	4,5	8G	0,8% пролина	–	4,5
4H	0,8% сорбита	10 mM Met	4,5	8H	0,8% пролина	10 mM Met	4,5
4J	0,8% сорбита	–	6,0	8J	0,8% пролина	–	6,0
4K	0,8% сорбита	10 mM Met	6,0	8K	0,8% пролина	10 mM Met	6,0
4L	0,8% сорбита	–	6,4	8L	0,8% пролина	–	6,4
4M	0,8% сорбита	10 mM Met	6,4	8M	0,8% пролина	10 mM Met	6,4

¹ Все композиции содержали 5 мг/мл пембролизумаба, 10 mM Гистидинового буфера и 0,004% PS80, в дополнение к эксципиентам композиций, перечисленным в Таблице

Композиции оценивали визуально на мутность (A350), UP-SEC (чистоту) и HP-

IEХ (профиль заряда). Через 10 дней при 50°C композиции, содержащие аргинин при рН 4,5 (7G & 7H), были заметно мутными. Все другие композиции, перечисленные в Таблице 24, не показали визуальных признаков агрегации. Показатели мутности (A350) измеряли через 10 дней, и они показаны в Таблице 25. Измеренные значения мутности для композиций при рН 6,0 были неизменно ниже тех, которые измеряли при рН 4,5 и 6,4, что свидетельствует о повышении стабильности при рН 6,0. Тенденцию увеличения мутности наблюдали для всех композиций при рН 6,4. Чистоту композиций тестировали через 10 дней при 50°C при помощи UP–SEC. Все композиции при рН 4,5 демонстрировали значительное снижение % mAb (данные не показаны) с соответствующим увеличением % агрегатов (HMW). Для всех композиций, протестированных при различных значениях рН, добавление метионина к композиции приводило к меньшей агрегации через 10 дней при 50°C, с наибольшими изменениями, наблюдаемыми во всех композициях при рН 4,5. Удивительно, что композиции 5G и 5H были значительно лучше, чем базовая композиция и демонстрировали наименьший % изменения % mAb (и наименьшее последующее увеличение % агрегатов) в течение периода оценки стабильности, что свидетельствует об относительном повышении стабильности этих композиций по сравнению с другими композициями при рН 4,5.

Профиль заряда композиций через 10 дней при 50°C определяли при помощи НР–IEХ (данные не показаны). Все композиции при соответствующем уровне рН демонстрировали похожие профили заряда для каждого протестированного стабилизатора. Композиции при рН 4,5 демонстрировали наименьший % кислотных и % пиков, предшествующих главному пику, после периода стабильности, хотя и с соответствующим значительным увеличением % основных вариантов (> 30%). Профили зарядов композиций при рН 6,0 были сопоставимы с таковыми в Примере 9 (Гистидин рН 5,5). Композиции при рН 6,4 демонстрировали профили заряда, противоположные профилям при рН 4,5, где наблюдали значительное изменение % кислотных вариантов (> 30%) только с небольшим увеличением % пика, предшествующего главному пику. % Главного пика во всех композициях был очень схожим для всех композиций, независимо от рН (41–43%). Добавление метионина к композициям не приводило к какому–либо значительному изменению профиля заряда.

Таблица 25

Композиции с низкой концентрацией пембролизумаба, включающие метионин, при различных значениях рН

Комп.	Стабилизатор	Антиоксидант	рН	% Агрегатов (UP–SEC)		Мутность (A350)
				10 дней/ 5°C	10 дней/ 50°C	
1G	1,4% сахарозы	–	4,5	2,76	54,57	0,021
1H	1,4% сахарозы	10 mM Met	4,5	2,77	50,72	0,019
1J	1,4% сахарозы	–	6,0	0,99	3,69	0,017

1K	1,4% сахарозы	10 mM Met	6,0	0,90	3,21	0,015
1L	1,4% сахарозы	–	6,4	4,09	6,14	0,029
1M	1,4% сахарозы	10 mM Met	6,4	3,85	5,67	0,024
2G	0,8% маннита	–	4,5	2,78	55,49	0,021
2H	0,8% маннита	10 mM Met	4,5	2,76	52,06	0,018
2J	0,8% маннита	–	6,0	1,02	3,38	0,014
2K	0,8% маннита	10 mM Met	6,0	0,99	3,26	0,014
2L	0,8% маннита	–	6,4	3,88	5,80	0,025
2M	0,8% маннита	10 mM Met	6,4	3,74	5,61	0,022
3G	1,4% трегалозы	–	4,5	2,75	54,87	0,028
3H	1,4% трегалозы	10 mM Met	4,5	2,75	50,90	0,020
3J	1,4% трегалозы	–	6,0	0,91	3,37	0,014
3K	1,4% трегалозы	10 mM Met	6,0	0,89	3,20	0,014
3L	1,4% трегалозы	–	6,4	3,79	5,79	0,022
3M	1,4% трегалозы	10 mM Met	6,4	3,74	5,51	0,020
4G	0,8% сорбита	–	4,5	2,77	55,48	0,023
4H	0,8% сорбита	10 mM Met	4,5	2,76	51,85	0,018
4J	0,8% сорбита	–	6,0	0,89	3,39	0,018
4K	0,8% сорбита	10 mM Met	6,0	0,98	3,25	0,015
4L	0,8% сорбита	–	6,4	3,71	5,64	0,023
4M	0,8% сорбита	10 mM Met	6,4	3,67	5,49	0,020
5G	0,4% глицина	–	4,5	2,83	27,06	0,017
5H	0,4% глицина	10 mM Met	4,5	2,83	25,90	0,015
5J	0,4% глицина	–	6,0	1,00	3,53	0,016
5K	0,4% глицина	10 mM Met	6,0	1,02	3,31	0,014
5L	0,4% глицина	–	6,4	3,66	5,82	0,022
5M	0,4% глицина	10 mM Met	6,4	3,62	5,50	0,024
6G	1,4% HPBC	–	4,5	2,73	60,52	0,024
6H	1,4% HPBC	10 mM Met	4,5	2,74	56,97	0,020
6J	1,4% HPBC	–	6,0	0,99	3,53	0,017
6K	1,4% HPBC	10 mM Met	6,0	0,97	3,36	0,016
6L	1,4% HPBC	–	6,4	3,82	5,90	0,029

6M	1,4% HPBC	10 mM Met	6,4	3,91	5,76	0,029
7G	0,8% аргинина	–	4,5	DNT ¹	DNT ¹	1,061
7H	0,8% аргинина	10 mM Met	4,5	DNT ¹	DNT ¹	1,090
7J	0,8% аргинина	–	6,0	0,94	6,36	0,019
7K	0,8% аргинина	10 mM Met	6,0	0,89	6,03	0,020
7L	0,8% аргинина	–	6,4	4,05	6,23	0,098
7M	0,8% аргинина	10 mM Met	6,4	3,74	6,20	0,044
8G	0,8% пролина	–	4,5	2,80	35,98	0,019
8H	0,8% пролина	10 mM Met	4,5	2,80	34,40	0,015
8J	0,8% пролина	–	6,0	1,00	3,50	0,016
8K	0,8% пролина	10 mM Met	6,0	0,90	3,32	0,015
8L	0,8% пролина	–	6,4	3,73	5,86	0,026
8M	0,8% пролина	10 mM Met	6,4	3,73	5,61	0,022

¹Не тестировали

Пример 12

Оценка композиций пембролизумаба, содержащих метионин и ДТРА в различных концентрациях

Предыдущие исследования предполагали, что добавление метионина (антиоксиданта) и металлохелатора может иметь преимущество в снижении агрегации (см. Пример 10). Чтобы исследовать влияние концентрации антиоксиданта и металлохелатора на подавление склонности к агрегации, был сформулирован и испытан ряд композиций, как описано ниже. Исходный раствор пембролизумаба (20 мг/мл)/PS80 (0,16 мг/мл) в гистидиновом буфере pH 5,5 получали как ранее описано в Примере 9. Исходные растворы (20 мг/мл) различных стабилизаторов (сахарозы, маннита, трегалозы, сорбита, глицина, HPBC, аргинина и пролина) вводили в исходный раствор пембро/PS80. Метионин использовали в качестве антиоксиданта, а ДТРА использовали в качестве металлохелатора. Как отмечено ранее, все исходные растворы, используемые для композиций, фильтровали через PES фильтры Millipore Express[®] PLUS Stericup[®] 0,22 мкм перед использованием. Конечные композиции для перечисленных в Таблице 26 композиций получали путем введения исходных растворов метионина (20 мг/мл) и ДТРА (0,1 мг/мл) в раствор пембро/PS80/стабилизатор в 96-луночном планшете и затем доводили до конечного объема 1 мл гистидиновым буфером pH 5,5. Планшет с лунками закрывали силиконовым уплотнительным матом для 96-луночных планшетов, а затем герметизировали в вакууме (2×) в мешках для защиты от влаги, чтобы минимизировать возможное испарение. Образцы помещали в камеры для исследования стабильности при 5°C и 50°C на 10 дней.

Композиции пембролизумаба, включающие метионин и ДТРА в различных концентрациях

Комп. ¹	Стабилизатор	Met, ² (мМ)	ДТРА (мкМ)	Комп.1	Стабилизатор	Met, ² (мМ)	ДТРА (мкМ)
1N	1,4% сахарозы	–	–	4R	0,8% сорбита	10	20
1P	1,4% сахарозы	5	10	4S	0,8% сорбита	5	30
1Q	1,4% сахарозы	15	10	4T	0,8% сорбита	15	30
1R	1,4% сахарозы	10	20	5N	0,4% глицина	–	–
1S	1,4% сахарозы	5	30	5P	0,4% глицина	5	10
1T	1,4% сахарозы	15	30	5Q	0,4% глицина	15	10
1U	1,4% сахарозы	5	–	5R	0,4% глицина	10	20
1V	1,4% сахарозы	10	–	5S	0,4% глицина	5	30
1W	1,4% сахарозы	15	–	5T	0,4% глицина	15	30
1X	1,4% сахарозы	–	10	6N	1,4% HPBC	–	–
1Y	1,4% сахарозы	–	20	6P	1,4% HPBC	5	10
1Z	1,4% сахарозы	–	30	6Q	1,4% HPBC	15	10
2N	0,8% маннита	–	–	6R	1,4% HPBC	10	20
2P	0,8% маннита	5	10	6S	1,4% HPBC	5	30
2Q	0,8% маннита	15	10	6T	1,4% HPBC	15	30
2R	0,8% маннита	10	20	7N	0,8% аргинина	–	–
2S	0,8% маннита	5	30	7P	0,8% аргинина	5	10
2T	0,8% маннита	15	30	7Q	0,8% аргинина	15	10
3N	1,4% трегалозы	–	–	7R	0,8% аргинина	10	20
3P	1,4% трегалозы	5	10	7S	0,8% аргинина	5	30
3Q	1,4% трегалозы	15	10	7T	0,8% аргинина	15	30
3R	1,4% трегалозы	10	20	7N	0,8% пролина	–	–
3S	1,4% трегалозы	5	30	7P	0,8% пролина	5	10
3T	1,4% трегалозы	15	30	7Q	0,8% пролина	15	10

4N	0,8% сорбита	–	–	7R	0,8% пролина	10	20
4P	0,8% сорбита	5	10	7S	0,8% пролина	5	30
4Q	0,8% сорбита	15	10	7T	0,8% пролина	15	30

¹Все композиции содержали 5 мг/мл пембролизумаба, 10 мМ Гистидинового буфера, pH 5,5 и 0,004% PS80 в дополнение к перечисленным эксципиентам.

²Метионин

Композиции оценивали визуально на мутность (A350), UP–SEC (чистоту), HP–IEC (профиль заряда). После 10–дневного периода испытания при 50°C ни одна из композиций не была заметно мутной и не имела изменения цвета. Показатели мутности для всех композиции (за исключением композиций с аргинином 7N – 7T) были очень схожими для различных протестированных композиций и близко напоминали значения, показанные в Примере 9 (данные не показаны). Из данных мутности эффект добавления различных концентраций метионина отдельно или в сочетании с различными концентрациями DTPA не был очевиден. Подобно результатам, показанным в Примерах 9 и 10, композиции, содержащие аргинин, демонстрировали наибольшее увеличение % HMW (Таблица 27) в течение периода испытания стабильности, хотя композиции 7Q и 7T (15 мМ метионина) демонстрировали наибольшее увеличение % HMW, что свидетельствует о потенциальном увеличении стабильности этих композиций по сравнению с другими с более низкими концентрациями метионина. Похожую тенденцию наблюдали для всех других композиций, где наименьший % HMW наблюдали в композициях, содержащих 15 мМ метионина и по меньшей мере 10 мкМ DTPA, хотя разница была очень небольшой.

Не было заметных различий в профиле заряда между какими–либо из композиций (за исключением 7C–7F, которые не тестировали) при 50°C в течение 10–дневного периода испытаний. Однако, было значительное снижение % главного пика (~53% → ~41%) и увеличение % кислотных вариантов и % пика, предшествующего главному пику, для всех композиций по сравнению с композициями, хранящимися при 5°C в течение 10 дней (данные не показаны).

Таблица 27

Композиции пембролизумаба, включающие метионин и DTPA в различных концентрациях

Композиция	Стабилизатор	Метионин (мМ)	DTPA (мкМ)	% Агрегатов (UP–SEC)	
				10 д/5°C	10 д/50°C
1N	1,4% сахарозы	–	–	0,92	5,1
1P	1,4% сахарозы	5	10	0,91	4,85
1Q	1,4% сахарозы	15	10	0,92	4,73
1R	1,4% сахарозы	10	20	0,91	4,8
1S	1,4% сахарозы	5	30	0,92	4,75

1T	1,4% сахарозы	15	30	0,92	4,54
1U	1,4% сахарозы	5	–	0,86	4,64
1V	1,4% сахарозы	10	–	0,92	4,55
1W	1,4% сахарозы	15	–	0,92	4,48
1X	1,4% сахарозы	–	10	0,92	4,8
1Y	1,4% сахарозы	–	20	0,91	4,79
1Z	1,4% сахарозы	–	30	0,87	4,82
2N	0,8% маннита	–	–	0,86	5,37
2P	0,8% маннита	5	10	0,92	5,14
2Q	0,8% маннита	15	10	0,92	4,96
2R	0,8% маннита	10	20	0,91	5,07
2S	0,8% маннита	5	30	0,86	5,03
2T	0,8% маннита	15	30	0,94	4,84
3N	1,4% трегалозы	–	–	0,86	5,03
3P	1,4% трегалозы	5	10	0,87	4,78
3Q	1,4% трегалозы	15	10	0,92	4,64
3R	1,4% трегалозы	10	20	0,87	4,70
3S	1,4% трегалозы	5	30	0,86	4,69
3T	1,4% трегалозы	15	30	0,87	4,53
4N	0,8% сорбита	–	–	0,77	5,3
4P	0,8% сорбита	5	10	0,93	5,1
4Q	0,8% сорбита	15	10	0,85	4,9
4R	0,8% сорбита	10	20	0,85	5,0
4S	0,8% сорбита	5	30	0,91	4,94
4T	0,8% сорбита	15	30	0,92	4,82
5N	0,4% глицина	–	–	0,9	5,12
5P	0,4% глицина	5	10	0,86	5,03
5Q	0,4% глицина	15	10	0,91	4,85
5R	0,4% глицина	10	20	0,93	4,96
5S	0,4% глицина	5	30	0,91	4,9
5T	0,4% глицина	15	30	0,89	4,75
6N	1,4% HPBC	–	–	0,91	5,03

6P	1,4% HPBC	5	10	0,91	5,08
6Q	1,4% HPBC	15	10	0,92	4,85
6R	1,4% HPBC	10	20	0,92	4,98
6S	1,4% HPBC	5	30	0,91	5,13
6T	1,4% HPBC	15	30	0,87	4,9
7N	0,8% аргинина	–	–	1,32	30,89
7P	0,8% аргинина	5	10	1,34	30,12
7Q	0,8% аргинина	15	10	1,54	27,09
7R	0,8% аргинина	10	20	1,54	28,89
7S	0,8% аргинина	5	30	1,54	29,82
7T	0,8% аргинина	15	30	1,53	27,39
7N	0,8% пролина	–	–	0,93	5,21
7P	0,8% пролина	5	10	0,86	4,93
7Q	0,8% пролина	15	10	0,92	4,81
7R	0,8% пролина	10	20	0,92	4,87
7S	0,8% пролина	5	30	0,92	5,04
7T	0,8% пролина	15	30	0,91	4,85

HP–HIC анализ осуществляли на выбранных композициях, показанных в Таблице 27, для оценки влияния концентраций метионина и ДТРА на стабильность и окисление через 10 дней при 50°C. Результаты для композиций 1N, 1Q и 1T указывают, что присутствие 15 мМ метионина приводило к наименьшему изменению окисления в течение периода оценки стабильности. В целом, результаты, показанные в Таблице 28, продемонстрировали, что добавление метионина к композициям приводило к снижению скорости окисления зависимым от концентрации образом (композиции 1U – 1W). Никакого дополнительного преимущества не наблюдалось при добавлении ДТРА (композиции 1X–1Z) в качестве хелатора даже в сочетании с добавлением метионина (композиции 1N – 1T).

Таблица 28

Композиции пембролизумаба, включающие метионин и ДТРА в различных концентрациях

Композиция	Стабилизатор	Метионин (мМ)	ДТРА (мкМ)	Met–105 (HP–HIC)	
				10 д/5°C	10 д/50°C
1N	1,4% сахарозы	–	–	8,45	23,50
1P	1,4% сахарозы	5	10	6,87	11,36
1Q	1,4% сахарозы	15	10	6,69	11,56

1R	1,4% сахарозы	10	20	6,90	9,38
1S	1,4% сахарозы	5	30	7,13	11,15
1T	1,4% сахарозы	15	30	6,80	8,56
1U	1,4% сахарозы	5	–	6,91	10,11
1V	1,4% сахарозы	10	–	6,76	8,88
1W	1,4% сахарозы	15	–	6,71	8,37
1X	1,4% сахарозы	–	10	8,00	25,05
1Y	1,4% сахарозы	–	20	8,43	24,94
1Z	1,4% сахарозы	–	30	8,16	25,37

Пример 13

Оценка эффекта pH на стабильность композиций с низкой концентрацией пембролизумаба в комбинации с метионином

Проводили дополнительное исследование для оценки влияния гистидинового буфера на стабильность композиций пембролизумаба. Для этого композиции, показанные в Примере 9, получали в воде для инъекций (без доведения pH) вместо 10 мМ гистидина pH 5,5. Лекарственное вещество пембролизумаб (~45 мг/мл) в 10 мМ гистидинового буфера pH 5,5 подвергали диализу водой для инъекций (WFI) до конечной концентрации 15,5 мг/мл. Исходный раствор пембролизумаба (15,5 мг/мл)/PS80 (0,16 мг/мл) получали путем добавления PS80 к раствору пембролизумаба (15,5 мг/мл) в WFI с последующей фильтрацией через PVE фильтрующий элемент SteriFlip® 0,22 мкм. Тестируемые композиции получали путем введения исходных растворов эксципиентов (полученных в WFI и отфильтрованных через 0,22 мкм PVE фильтр) в исходные растворы пембролизумаба/PS80 с получением концентраций, показанных в Таблице 29. Аналогично исследованию в Примерах 9 и 10, добавляли 10 мМ метионина и 20 мкМ DTPA или 50 мкМ EDTA для оценки способности снижать агрегацию в течение периода испытания стабильности. Композиции получали в 96-луночном планшете с конечным объемом лекарственного продукта 1 мл. Планшет с лунками закрывали силиконовым уплотнительным матом, а затем герметизировали в вакууме в мешках для защиты от влаги (2×). Композиции помещали в условия 5°C и 50°C на 10 дней.

Таблица 29

Композиции с низкой концентрацией пембролизумаба, полученные в WFI

Комп. 1	Стабилизатор	Антиоксидант (10 мМ)	Металлохелатор	Комп. 1	Стабилизатор	Антиоксидант (10 мМ)	Металлохелатор
1A'	1,4% сахарозы	–	–	5A'	0,4% глицина	–	–
1B'	1,4% сахарозы	Met	–	5B'	0,4% глицина	Met	–
1C'	1,4% сахарозы	–	DTPA	5C'	0,4% глицина	–	DTPA
1D'	1,4% сахарозы	Met	DTPA	5D'	0,4% глицина	Met	DTPA
1E'	1,4% сахарозы	–	EDTA	5E'	0,4% глицина	–	EDTA
1F'	1,4% сахарозы	Met	EDTA	5F'	0,4% глицина	Met	EDTA
2A'	0,8% маннита	–	–	6A'	1,4% HPBC	–	–
2B'	0,8% маннита	Met	–	6B'	1,4% HPBC	Met	–
2C'	0,8% маннита	–	DTPA	6C'	1,4% HPBC	–	DTPA
2D'	0,8% маннита	Met	DTPA	6D'	1,4% HPBC	Met	DTPA
2E'	0,8% маннита	–	EDTA	6E'	1,4% HPBC	–	EDTA
2F'	0,8% маннита	Met	EDTA	6F'	1,4% HPBC	Met	EDTA
3A'	1,4% трегалозы	–	–	7A'	0,8% аргинина	–	–
3B'	1,4% трегалозы	Met	–	7B'	0,8% аргинина	Met	–
3C'	1,4% трегалозы	–	DTPA	7C'	0,8% аргинина	–	DTPA
3D'	1,4% трегалозы	Met	DTPA	7D'	0,8% аргинина	Met	DTPA
3E'	1,4% трегалозы	–	EDTA	7E'	0,8% аргинина	–	EDTA
3F'	1,4% трегалозы	Met	EDTA	7F'	0,8% аргинина	Met	EDTA
4A'	0,8% сорбита	–	–	8A'	0,8% пролина	–	–
4B'	0,8% сорбита	Met	–	8B'	0,8% пролина	Met	–
4C'	0,8% сорбита	–	DTPA	8C'	0,8% пролина	–	DTPA
4D'	0,8% сорбита	Met	DTPA	8D'	0,8% пролина	Met	DTPA
4E'	0,8% сорбита	–	EDTA	8E'	0,8% пролина	–	EDTA

4F'	0,8% сорбита	Met	EDTA	8F'	0,8% пролина	Met	EDTA
-----	-----------------	-----	------	-----	-----------------	-----	------

¹ Все композиции содержали 5 мг/мл пембролизумаба и 0,004% PS80 в дополнение к перечисленным эксципиентам

Полученные композиции тестировали путем оценки внешнего вида, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (термическое разворачивание), путем оценки мутности, UP–SEC (чистота) и HP–IEX (профиль заряда). Ни одна из композиций не показала изменения цвета и не была заметно мутной при извлечении из условий оценки стабильности. Измеренные значения мутности были очень схожи во всех протестированных композициях. В отличие от результатов измерения мутности для композиций аргинина, полученных в 10 мМ гистидинового буфера pH 5,5 (7A–7F, примеры 1 и 2), композиции, полученные в WFI (7A' – 7F'), показали значительно более низкие значения мутности после периода испытания на стабильность (данные не показаны).

По сравнению с композициями, полученными в Примерах 9 и 10, аналогичные композиции, полученные в WFI, показали умеренное улучшение поведения термического разворачивания за счет сдвига Tm1 к более высокой температуре (таблица 30). Исключением из этого утверждения являются композиции с маннитом 2E' (EDTA) и 2F' (Met+EDTA), которые показали практически идентичные значения Tm1 с теми композициями, которые были получены в Примерах 9 и 10 (данные не показаны). Композиции 6A' – 6F' не показали тепловых переходов, предположительно, в результате преимущественного связывания красителя SYPRO™ с карманом циклодекстрина. Для всех протестированных композиций, присутствие только EDTA (50 мкМ) в качестве металлохелатора приводило к более низким значениям Tm1, чем соответствующие композиции с Met, Met+DTPA, DTPA или Met+EDTA.

Изменение в pH незабуференных композиций измеряли в течение периода испытания стабильности, чтобы оценить способность к самобуферизации композиции пембролизумаба (см. Таблицу 30). Композиции 1–5F' (Met+EDTA) демонстрировали наименьшее изменение в pH в течение 10 дней при 50°C. Что касается Cavitron® (HPBC) композиций (6A' – 6F'), наименьшее изменение в pH наблюдали в композиции 6B', в которой использовали метионин, в то время как наименьшее изменение в pH, наблюдаемое для композиций аргинина (7A' – 7F'), наблюдали в композиции 7A' (без метионина или металлохелатора).

Таблица 30

Композиции пембролизумаба, полученные в WFI

Комп. п.	Стабилизатор	Антиоксидант (10 мМ)	Металлохелатор	DSF (термическое разворачивание)	pH	
				Tm1 (°C)	10 дней/ 5°C	10 дней/ 50°C
1A'	1,4% сахарозы	–	–	66,0	5,92	5,71

1B'	1,4% сахарозы	Met	–	60,8	6,22	5,73
1C'	1,4% сахарозы	–	DTPA	65,4	6,00	5,53
1D'	1,4% сахарозы	Met	DTPA	58,6	6,02	5,52
1E'	1,4% сахарозы	–	EDTA	60,8	6,22	5,77
1F'	1,4% сахарозы	Met	EDTA	65,2	5,79	5,75
2A'	0,8% маннита	–	–	66,8	6,16	5,42
2B'	0,8% маннита	Met	–	65,6	6,15	5,61
2C'	0,8% маннита	–	DTPA	65,2	6,06	5,52
2D'	0,8% маннита	Met	DTPA	65,0	5,92	5,52
2E'	0,8% маннита	–	EDTA	58,6	5,45	5,71
2F'	0,8% маннита	Met	EDTA	58,6	5,59	5,72
3A'	1,4% трегалозы	–	–	65,4	6,14	5,78
3B'	1,4% трегалозы	Met	–	65,8	6,33	5,80
3C'	1,4% трегалозы	–	DTPA	65,4	6,07	5,63
3D'	1,4% трегалозы	Met	DTPA	65,0	5,97	5,64
3E'	1,4% трегалозы	–	EDTA	61,4	5,84	5,79
3F'	1,4% трегалозы	Met	EDTA	65,6	5,79	5,82
4A'	0,8% сорбита	–	–	65,4	6,01	5,85
4B'	0,8% сорбита	Met	–	65,4	6,29	5,85
4C'	0,8% сорбита	–	DTPA	66,0	6,04	5,66
4D'	0,8% сорбита	Met	DTPA	65,6	6,02	5,67
4E'	0,8% сорбита	–	EDTA	61,2	5,78	5,80
4F'	0,8% сорбита	Met	EDTA	65,6	5,71	5,81
5A'	0,4% глицина	–	–	66,6	6,25	5,91
5B'	0,4% глицина	Met	–	65,2	6,33	5,91
5C'	0,4%	–	DTPA	65,2	6,10	5,76

	глицина					
5D'	0,4% глицина	Met	DTPA	66,2	6,07	5,75
5E'	0,4% глицина	–	EDTA	65,4	6,04	5,90
5F'	0,4% глицина	Met	EDTA	65,4	5,92	5,89
6A'	1,4% HPBC	–	–	–	6,17	5,82
6B'	1,4% HPBC	Met	–	–	6,20	5,90
6C'	1,4% HPBC	–	DTPA	–	6,17	5,68
6D'	1,4% HPBC	Met	DTPA	–	6,04	5,66
6E'	1,4% HPBC	–	EDTA	–	6,23	5,87
6F'	1,4% HPBC	Met	EDTA	–	6,24	5,87
7A'	0,8% аргинина	–	–	64,2	6,02	5,92
7B'	0,8% аргинина	Met	–	58,8	6,21	5,95
7C'	0,8% аргинина	–	DTPA	58,6	6,10	5,81
7D'	0,8% аргинина	Met	DTPA	63,4	6,03	5,78
7E'	0,8% аргинина	–	EDTA	64,2	6,24	5,85
7F'	0,8% аргинина	Met	EDTA	64,2	6,21	5,94
8A'	0,8% пролина	–	–	61,6	6,29	5,87
8B'	0,8% пролина	Met	–	59,2	6,28	5,90
8C'	0,8% пролина	–	DTPA	65,8	6,14	5,78
8D'	0,8% пролина	Met	DTPA	59,0	6,11	5,73
8E'	0,8% пролина	–	EDTA	59,0	6,30	5,93
8F'	0,8% пролина	Met	EDTA	65,0	6,29	5,92

Количество агрегации каждой из композиций в течение 10–дневного периода при 50°C также измеряли при помощи UP–SEC. % mAb и % агрегатов (HMW) для всех протестированных композиций были очень схожими, за исключением композиций 7A' – 7F' (композиции аргинина), которые демонстрировали увеличение в % HMW (~ 4%). Из данных UP–SEC не было четких доказательств того, что добавление метионина (10 мМ), DTPA (20 мкМ), EDTA (50 мкМ) или его комбинаций значительно снижало агрегацию.

Профили зарядов композиций через 10 дней при 50°C определяли при помощи НР-ІЕХ (данные не показаны). Все композиции демонстрировали схожие профили заряда для каждого протестированного стабилизатора. Значительное снижение % главного пика (~53% → ~41%) и увеличение % кислотных вариантов и % пика, предшествующего главному пику, для всех композиций наблюдали по сравнению с композициями, хранящимися при 5°C в течение 10 дней (данные не показаны). Композиции, полученные в WFI, демонстрировали более высокий % кислотных пиков (~28%) с сопоставимыми % пика, предшествующего главному пику, и % щелочных вариантов с аналогичными композициями в Примерах 9 и 10 через 10 дней при 50°C. Добавление метионина, ДТРА, EDTA или их комбинаций, к композициям не приводило к какому-либо значительному изменению профиля заряда.

Пример 14

Разработка высококонцентрированной композиции лиофилизированного лекарственного продукта, включающей пембролизумаб

Краткое описание плана экспериментов и результатов для всех партий лекарственного продукта представлено в Таблице 32. Все композиции содержали гистидиновый буфер (pH 5,5) и полисорбат 80 (PS 80) в качестве поверхностно-активного вещества. Различные тестируемые композиции изготавливали с использованием различных криопротекторов, стабилизаторов и т.д. с различными концентрациями пембролизумаба и эксципиентов. Следующие партии лекарственного вещества пембролизумаба использовали для формулирования тестируемых композиций для исследований:

204 мг/мл пембролизумаба в 10 мМ гистидинового буфера, pH 5,5

288 мг/мл пембролизумаба в 3% аргинин.HCl, 10 мМ гистидинового буфера, pH 5,5

Процессы лиофилизации для исследований осуществляли с использованием модели LYOSTAR 3 (SP Scientific), как описано в Таблице 31.

Партия 0021: Партию 0021 получали, исходя из 103 мг/мл пембролизумаба, формулированного в сахарозе. Объем 2,30 мл заполняли в 2R флаконы, 6R флаконы и 10R флаконы. Использовали 55-часовой цикл лиофилизации (“лио цикл А,” см., Таблицу 31). После лиофилизации измеряли остаточную влажность, шприцуемый объем и объем расширения. Обычно наблюдали диапазон времени восстановления 17–28 минут.

Партия 0022: Партию 0022 получали, исходя из 48–103 мг/мл пембролизумаба, сформулированного в различных комбинациях сахарозы, маннита и аргинин гидрохлорида (Arg.HCl). Объем 2,30–4,97 мл заполняли в 2R флаконы, 6R флаконы, 10R флаконы и 10R флаконы. Была использована более длительная первичная сушка, увеличенная на 5 часов. Таким образом, использованный цикл лиофилизации был аналогичен циклу лиофилизации А, продленному до 60 часов (“лио цикл В” см., Таблицу 31). Обычно время восстановления составляло от 4 до 23 минут. Остаточная влажность составляла от 0,24 до 0,26%.

Партия 0024: Партию 0024 получали, исходя из 104–200 мг/мл пембролизумаба,

сформулированного в различных комбинациях сахарозы и аргинин гидрохлорида (Arg.HCl). В качестве лекарственного вещества использовали 288 мг/мл пембролизумаба в 3% Arg, 10 mM His pH 5,5. Объем 1,24–2,30 мл заполняли в 2R флаконы. Для процесса лиофилизации одну полку полностью загружали 7%-ными флаконами сахарозы. Время вторичной сушки было сокращено с 8 до 6 часов. Таким образом, использованный цикл лиофилизации имел время вторичной сушки на 2 часа короче по сравнению с циклом лиофилизации А (“лио цикл С” см., Таблицу 31). Как правило, время восстановления составляло от 37 до 42 минут. Были некоторые трудности с растворением лиофилизационной лепешки, которые не уменьшались с введением стадии центрифугирования. Измеренная остаточная влажность составляла 0,27%.

Партия 0025: Партию 0025 получали с 25 мг/мл пембролизумаба, сформулированного в сахарозе. Объем 10,66 мл заполняли в 15R флаконы. Был принят консервативный вариант цикла лиофилизации А (примерно 136 часов, (“лио цикл D” см., Таблицу 31). Среди других изменений использовали более длительную стадию первичной сушки. Обычно время восстановления составляло от 2 минут 20 секунд до 4 минут 40 секунд. Остаточная влажность составляла 0,4–0,5%.

Партия 0027: Партию 0027 получали с 25 мг/мл и 35 мг/мл пембролизумаба в сахарозе. Объем 6,8–9,5 мл заполняли в 15R флаконы. Был принят консервативный вариант цикла лиофилизации А (~ 136 часов, “лио цикл E” см., Таблицу 31) с более длительной первичной стадией сушки, состоящей из двухстадийного процесса сушки (–20°C и –10°C). Содержимое флаконов восстанавливали с меньшим объемом (1,0 мл) воды. Обычно время восстановления составляло от 4 минут 20 секунд до 6 минут 15 секунд. Остаточная влажность составляла от 0,14 до 0,17%. Скорость извлечения восстановленного раствора через шприц была чрезвычайно медленной и сложной при использовании 3-мл шприца, снабженного иглой 27G ½”.

Партия 0028: Партию 0028 получали с (1) 25 мг/мл или 35 мг/мл пембролизумаба в сахарозе, (объем 6,78–9,6 мл, заполненный в 15R или 20R флаконы) или (2) 35 мг/мл пембролизумаба в аргинине (объем 6,78 мл, заполненный в 15R флаконы). Цикл лиофилизации А использовали без изменения (примерно 55 часов). Содержимое флаконов разводили 1,2 мл воды. Как правило, время восстановления составляло от 5 минут 10 секунд до 6 минут 15 секунд. Остаточная влажность составляла от 0,60 до 0,85%. 3-мл шприцы, снабженные иглами 27G½”, легче заполнять и опорожнять аргининсодержащим восстановленным раствором по сравнению с композициями с сахарозой, что, как предполагалось, являются результатом вязкости.

В этом Примере оценивали лиофилизированные композиции, которые были приготовлены с исходными растворами, содержащими 200 мг пембролизумаба, при концентрациях белка от 48 до 200 мг/мл. Все композиции лиофилизировали с получением белой лепешки. После лиофилизации, лепешки восстанавливали при помощи SWFI и восстановленные растворы оценивали на тоничность, вязкость и время восстановления. Леофилизированные лепешки восстанавливали с меньшим количеством воды, чем объем

заполнения, чтобы получить приблизительную концентрацию 167 мг/мл (т.е. 200 мг/флакон). Лиофилизированные лепешки, изготовленные с высококонцентрированными пред-лио растворами (> 100 мг/мл), как правило, по природе были более компактными.

Время восстановления для различных композиций варьировалось от 2 до 42 минут (см. Таблицу 32). В целом, время восстановления было больше при увеличении концентрации белка в пред-лио растворе. Результаты анализа восстановленного раствора указывают, что аргинин гидрохлорид имел такой же эффект для уменьшения времени восстановления, что и протестированные эксципиенты, но мог способствовать снижению вязкости восстановленного раствора. Влияние других эксципиентов (например, сахарозы, маннита) и параметров процесса лиофилизации на время восстановления оказалось незначительным.

Циклы лиофилизации, используемые для Примера 14

Партия №/цикл лиофилизации	Замораживание	Первичная сушка	Вторичная сушка
0021 Цикл А	Загрузка 5°C Линейное изменение до -10°C, 20 мин. Поддержание при - 10°C, 1 час Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при - 50°C, 1 час Линейное изменение до -10°C, 1 час 20 мин. Поддержание при - 10°C, 3 часа Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при - 50°C, 1 час	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до -15°C, 45 мин. Поддержание при - 15°C, 24 часа Линейное изменение до -5°C, 5 часов	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до 30°C, 1 час 10 мин. Поддержание при 30°C, 8 часов Линейное изменение до 5°C, 30 мин. Заполнение азотом
0022 Цикл В	Загрузка 5°C Линейное изменение до -10°C, 20 мин. Поддержание при - 10°C, 1 час Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при - 50°C, 1 час Линейное изменение до -10°C, 1 час 20 мин. Поддержание при - 10°C, 3 часа Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при - 50°C, 1 час	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до -15°C, 45 мин. Поддержание при - 15°C, 29 часов Линейное изменение до -5°C, 5 часов	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до 30°C, 1 час 10 мин. Поддержание при 30°C, 8 часов Линейное изменение до 5°C, 30 мин. Заполнение азотом

0024 Цикл С	Загрузка 5°C Линейное изменение до -10°C, 20 мин. Поддержание при -10°C, 1 час Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час Линейное изменение до -10°C, 1 час 20 мин. Поддержание при -10°C, 3 часа Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до -15°C, 45 мин. Поддержание при -15°C, 29 часов Линейное изменение до -5°C, 5 часов	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до 30°C, 1 час 10 мин. Поддержание при 30°C, 6ч Линейное изменение до 5°C, 30 мин. Заполнение азотом
0025 Цикл D	Загрузка 5°C Линейное изменение до -10°C, 20 мин. Поддержание при -10°C, 1 час Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час Линейное изменение до -10°C, 1 час 20 мин. Поддержание при -10°C, 3 часа Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до -20°C, 2 часа Поддержание при -20°C, 103 часа Линейное изменение до -5°C, 7h 30 мин.	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до 30°C, 1 час 10 мин. Поддержание при 30°C, 8 часов Линейное изменение до 5°C, 30 мин. Заполнение азотом

0027 Цикл Е	Загрузка 5°C Линейное изменение до -10°C, 20 мин. Поддержание при -10°C, 1 час Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час Линейное изменение до -10°C, 1 час 20 мин. Поддержание при -10°C, 3 часа Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до -20°C, 5 часов Поддержание при -20°C, 60h Линейное изменение до -15°C, 3 часа Поддержание при -15°C, 31 час Линейное изменение до -5°C, 9 часов	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до 30°C, 6ч Поддержание при 30°C, 8 часов Линейное изменение до 5°C, 30 мин. Заполнение азотом
0028 Цикл А	Загрузка 5°C Линейное изменение до -10°C, 20 мин. Поддержание при -10°C, 1 час Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час Линейное изменение до -10°C, 1 час 20 мин. Поддержание при -10°C, 3 часа Линейное изменение до -50°C, 2 часа 40 мин. Поддержание при -50°C, 1 час	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до -15°C, 45 мин. Поддержание при -15°C, 24 часа Линейное изменение до -5°C, 5 часов	Установка давления на 113 мТорр Линейное изменение до 30°C, 1 час 10 мин. Поддержание при 30°C, 8 часов Линейное изменение до 5°C, 30 мин. Заполнение азотом

Таблица 32

Результаты экспериментов лиофилизации

Партия №	Эксперимент	Композиция (пред-лио)	Заполнение (мл)/флакон(ы)	Восстановленная композиция	Свойства (% влажности, данные восстановления и т.д)
----------	-------------	-----------------------	---------------------------	----------------------------	---

0021	103 мг/мл с сахароз ой	6,18 mM His pH 5,5, 4,32% сах., 0,01% PS 80	Заполнен ие 2,3 мл/2R, 6R, 10R флаконы	166,7 мг/мл пембро, 10 mM His pH 5,5, 7% сах., 0,02% PS 80	6R: 0,10%; 1,0мл воды – 21 мин (170 мг/мл)	10R: 0,11%; 1,0мл воды – 17 мин.	2R: 0,13%; 1,0мл воды – 28 мин.
0022 А	103 мг/мл с маннит ом/ сахароз ой	6,2 mM His, 1,04% сах., 2,6% маннита, 0,12% PS80	2,3 мл в 2R и 6R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 4,2% маннита, 1,68% сах., 10 mM His, 0,02% PS80	23 мин. с 1,1 мл воды		
0022 В	75 мг/мл с сахароз ой	4,5 mM His, 3,15% сах., 0,014% PS 80	3,2 мл в 6R, 10R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 10 mM His, 7% сах., 0,03% PS 80	15 мин. с 1,1 мл воды		
0022 С	55,3 мг/мл с сахароз ой	2,32% сах., 3,32 mM His, 0,01% PS 80	4,34 мл в 10R, 15R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 7% сах., 10 mM His, 0,03% PS–80	4 мин. с 1,1 мл воды (131,6 мг/мл)	Влажнос ть 0,21% (15 мл флакон)	
0022 D	48,33 мг/мл с сах./Ar g	1% Arg, 1,83% сах., 3,32 mM His, 0,01% PS–80	4,97 мл в 10R, 15R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 3% Arg, 5,5% сах., 10 mM His, 0,03% PS–80	5 мин. с 1,1 мл воды в 10R флаконе (142,9 мг/мл)	4 мин. с 1,1 мл воды в 15R флаконе (158,8 мг/мл)	Влажность 0,24% (10 мл флакон), 0,26% (15 мл флакон)
0022 E	55,3 мг/мл с Arg	1% Arg, 3,32 mM His, 0,01% PS 80	4,34 мл в 15R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 3% Arg, 10 mM His, 0,03% PS–80	10 мин. с 1,1 мл воды (173 мг/мл)		

0024 А	104 мг/мл с сах./Arg g	3,13% сах., 1,25% Arg.HCl, 0,01% PS-80 в 6,26 mM His	2,3 мл в 2R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 5% сах., 2% Arg, 0,02% PS-80 в 10 mM His	40 мин. с 1,2 мл воды, 169,4 мг/мл; с 0,9% солевым раствором > 50 мин.	Восстан овление на центриф уге: 45 мин., без пенообр азования (× 1000– 3000 g)	Не может растворять ся в метаноле
0024 В	104 мг/мл с сах./Arg g	2,32% сах., 1,25% Arg.HCl, 0,01% PS-80 в 6,26 mM His	2,3 мл в 2R флаконах	166,7 мг/мл пембро 3,7% сах., 2% Arg, 0,02% PS 80, 10 mM His	37 мин. с 1,2 мл воды, 165,3 мг/мл	Восстан овление на центриф уге: 35 мин., без пенообр азования (× 1000– 3000 g)	Влажность 0,27%
0024 С	200 мг/мл с сах./Arg g	3,7% сах., 2,08% Arg.HCl, 0,02% PS-80 в 10 mM His	1,24 мл в 2R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 3,7% сах., 2% Arg, 0,02% PS 80, 8,3 mM His	42 мин. с 1,2 мл воды, 173,7 мг/мл	Восстан овление на центриф уге: 45 мин., без пенообр азования (× 3000 g)	Не может растворять ся в метаноле
0025 А	25 мг/мл с сахароз ой	1,05% сах., 1,5 mM His, 0,003% PS-80	10,66 мл в 15R флаконе	166,7 мг/мл пембро, 7% сах., 0,02% PS 80, 10 mM His	4 мин. 40 сек. с 1,2 мл воды; 183 мг/мл	Влажнос ть 0,5%	
0025 В	25 мг/мл с сахароз ой	2,10% сах., 1,5 mM His, 0,003% PS-80	10,66 мл в 15R флаконе	166,7 мг/мл пембро, 14% сах., 0,02% PS 80, 10 mM His	2 мин. 20 сек с 1,2 мл воды; 173 мг/мл	Влажнос ть 0,4%	

0027 А	35 мг/мл с сахароз ой	1,47% сах., 2,1 мМ His, 0,004% PS-80	6,8 мл в 15R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 7% сах., 0,02% PS 80,10 мМ His	6 мин. 15 сек. с 1,0 мл воды (189 мг/мл)	Влажнос ть 0,17%	1,1 мл забранного через шприц раствора; скорость – очень медленная с 3–мл шприцем, снабженны м иглой 27G ½”
0027 В	25 мг/мл с сах.	1,05% сах., 1,5 мМ His, 0,003% PS-80	9,5 мл в 15R и 20R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 7% сах., 0,02% PS 80,10 мМ His	4 мин. 20 сек. с 1,0 мл воды (194 мг/мл)	Влажнос ть 0,16% (15R флакон); 0,14% (20R флакон)	1,1 мл забранного через шприц раствора; скорость – очень медленная с 3–мл шприцем, снабженны м иглой 27G ½”
0028 А	35 мг/мл с сах.	1,454% сах., 2,07 мМ His, 0,004% PS-80	6,78 мл в 15R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 7% сах., 0,02% PS-80 в 10 мМ His	5 мин. 20 сек. с 1,2 мл воды (166 мг/мл)	Влажнос ть 0,60%	Объем забранного через шприц DP, 3–мл шприц+27 G 0,5" игла (мл) = 1,3 мл (Помеченн ый объем=1,2 мл)
0028 В	25 мг/мл с сах.	1,04% сах., 1,48 мМ His, 0,003% PS-80	9,60 мл в 20R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 7% сах., 0,02% PS-80 в 10 мМ His	6 мин. 15 сек. с 1,2 мл воды (165 мг/мл)	Влажнос ть 0,85%	Объем забранного через шприц DP, 3–мл шприц +27G 0,5" игла (мл) = 1,3 мл (Помеченн ый объем=1,2 мл)

0028 С	35 мг/мл с Arg.HC 1	0,623% Arg, 2,07 мМ His, 0,0042% PS-80	6,78 мл в 15R флаконах	166,7 мг/мл пембро, 3% Arg, 0,02% PS-80 в 10 мМ His	5 мин. 10 сек. с 1,2 мл воды (169 мг/мл)	Влажнос ть 0,81%	Объем забранного через шприц DP, 3-мл шприц +27G 0,5" игла (мл) = 1,3 мл (Помеченн ый объем=1,2 мл); легче заполнить шприц
-----------	------------------------------	--	------------------------------	--	--	---------------------	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция антитела к человеческому PD-1, включающая:
 - a) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента;
 - b) от приблизительно 5 mM до приблизительно 20 mM буфера;
 - c) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из:
 - i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина;
 - ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L-аргинина, фармацевтически приемлемой соли L-аргинина, L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и
 - iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли;
 - d) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,10% неионного поверхностно-активного вещества; и
 - e) от приблизительно 1 mM до приблизительно 20 mM антиоксиданта.
2. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.1, где композиция имеет pH между 4,5 и 6,4.
3. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.1, где композиция имеет pH между 5,0 и 6,0.
4. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–3, где буфер представляет собой гистидиновый буфер или ацетатный буфер.
5. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–4, где стабилизатор выбран из группы, состоящей из:
 - i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина;
 - ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% маннита, сорбита или L-пролина или фармацевтически приемлемой соли L-пролина; и
 - iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или его фармацевтически приемлемой соли.
6. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.5, где композиция дополнительно включает от приблизительно 1% до приблизительно 3% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.
7. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.5, где концентрация антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл.
8. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–2 или 4, где стабилизатор включает от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или L-аргинина HCl и pH композиции находится на уровне от приблизительно 6,0 до приблизительно 6,4.

9. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–7, где буфер представляет собой гистидиновый буфер, стабилизатор представляет собой сахарозу, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 и антиоксидант представляет собой L-метионин или его фармацевтически приемлемую соль, при этом композиция включает:

- а) от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента;
- б) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ гистидинового буфера;
- с) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы;
- д) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% масс/об полисорбата 80; и
- е) от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ L-метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

10. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.9, дополнительно включающая от приблизительно 1% до приблизительно 3% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

11. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.10, где L-аргинин или его фармацевтически приемлемая соль, присутствует в массовом соотношении от приблизительно 1,25% до приблизительно 2,5%.

12. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–11, где буфер представляет собой гистидиновый буфер, который присутствует в концентрации от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ.

13. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–12, где антиоксидант представляет собой L-метионин или его фармацевтически приемлемую соль, который присутствует в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ.

14. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–13, где неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, который присутствует в массовом соотношении приблизительно 0,02% масс/об.

15. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–14, где концентрация антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл.

16. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–15, где стабилизатор представляет собой сахарозу, которая присутствует в массовом соотношении приблизительно 7% масс/об.

17. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.1, где буфер представляет собой гистидиновый буфер, стабилизатор представляет собой сахарозу, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 и антиоксидант представляет собой L-метионин или его фармацевтически приемлемую соль, при этом композиция включает:

- а) от приблизительно 75 до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому

PD–1 или его антигенсвязывающего фрагмента;

б) от 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера;

с) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L–метионина или его фармацевтически приемлемой соли;

д) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масс/об сахарозы; и

е) от 0,01% до приблизительно 0,04% масс/об полисорбата 80.

18. Композиция антитела к человеческому PD–1 по п.17, включающая:

а) от приблизительно 125 до приблизительно 200 мг/мл антитела к человеческому PD–1 или его антигенсвязывающего фрагмента;

б) приблизительно 10 мМ гистидинового буфера;

с) приблизительно 10 мМ L–метионина или его фармацевтически приемлемой соли;

д) приблизительно 7 масс/об сахарозы; и

е) приблизительно 0,02% масс/об полисорбата 80.

19. Композиция антитела к человеческому PD–1 по п.18, где антиоксидант представляет собой L–метионин HCl.

20. Композиция антитела к человеческому PD–1 по любому из пп. 17–19, дополнительно включающая от приблизительно 1,25% до приблизительно 2,5% масс/об L–аргинина или его фармацевтически приемлемой соли.

21. Композиция антитела к человеческому PD–1 по п.20, где L–аргинин или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой L–аргинин HCl.

22. Композиция антитела к человеческому PD–1 по любому из пп. 1–7 и 9–21, где композиция имеет pH от 5,3 до 5,8.

23. Композиция антитела к человеческому PD–1 по п.1, включающая:

а) от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл антитела к человеческому PD–1 или его антигенсвязывающего фрагмента;

б) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера;

с) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из:

i) от приблизительно 6% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы, трегалозы или (2–гидроксипропил)–β–циклодекстрина;

ii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% масс/об маннита, сорбита, L–пролина или фармацевтически приемлемой соли L–пролина; и

iii) от приблизительно 1,8 до приблизительно 2,2% масс/об глицина или фармацевтически приемлемой соли глицина;

д) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80; и

е) от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ L–метионина или его фармацевтически приемлемой соли.

24. Композиция антитела к человеческому PD–1 по п.23, где стабилизатор представляет собой (2–гидроксипропил)–β–циклодекстрин.

25. Композиция антитела к человеческому PD–1 по любому из пп. 1–24, где

композиция дополнительно включает металлохелатор.

26. Композиция антитела к человеческому PD-1 по п.25, где металлохелатор представляет собой ДТРА, который присутствует в концентрации от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 30 мкМ.

27. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–26, которая представляет собой жидкость.

28. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–26, которая представляет собой восстановленный раствор из лиофилизированной композиции.

29. Жидкая композиция антитела к человеческому PD-1, которая восстановлена из лиофилизированной композиции, где восстановленный раствор включает:

а) от приблизительно 125 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл антитела к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента;

б) от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ гистидинового буфера;

с) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из:

i) от приблизительно 3% до приблизительно 8% масса/объем (масс/об) сахарозы;

ii) от приблизительно 2% до приблизительно 5% масс/об L-аргинина или его фармацевтически приемлемой соли;

iii) от приблизительно 3% до приблизительно 5% маннита и от приблизительно 1% до приблизительно 2% сахарозы; и

iv) комбинации i) и ii); и

д) от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,04% полисорбата 80.

30. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–29, где композиция содержится в стеклянном флаконе или инъекционном устройстве.

31. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–30, где композиция имеет одну или несколько следующих характеристик после хранения при 2–8°C в течение 12 месяцев:

а) % тяжелой цепи и легкой цепи, измеренный методом CE-SDS в восстанавливающих условиях, составляет $\geq 90,0\%$,

б) % интактного IgG, измеренный методом CE-SDS в невосстанавливающих условиях, составляет $\geq 90,0\%$, и

с) % мономера, измеренный методом HP-SEC, составляет $\geq 95\%$.

32. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–31, где после хранения композиции при 2–8°C в течение 12 месяцев % тяжелой цепи и легкой цепи, измеренный методом CE-SDS в восстанавливающих условиях, составляет $\geq 96\%$.

33. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–32, где после хранения композиции при 2–8°C в течение 12 месяцев % интактного IgG, измеренный методом CE-SDS в невосстанавливающих условиях, составляет $\geq 97\%$.

34. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–33, где после хранения композиции при 2–8°C в течение 12 месяцев % мономера, измеренный методом HP-SEC, составляет $\geq 98,5$.

35. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–34, где антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент включает три CDR легкой цепи, включающие CDRL1 SEQ ID NO:1, CDRL2 SEQ ID NO:2 и CDRL3 SEQ ID NO:3 и три CDR тяжелой цепи CDRH1 SEQ ID NO:6, CDRH2 SEQ ID NO:7 и CDRH3 SEQ ID NO:8.

36. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–35, где антитело к человеческому PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент включает V_L область, которая включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, и V_H область, которая включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9.

37. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–36, где композиция включает легкую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO:5, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO:10.

38. Композиция антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–37, где композиция включает антитело к человеческому PD-1, которое представляет собой пембролизумаб.

39. Способ лечения хронической инфекции у пациента–человека, включающий: введение пациенту эффективного количества композиции антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–38.

40. Способ лечения рака у пациента–человека, включающий введение пациенту эффективного количества композиции антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–38.

41. Способ по п.38, где рак представляет собой меланому, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, уротелиальный рак, рак молочной железы, рак желудка, аденокарциному гастроэзофагеального перехода, множественную миелому, гепатоцеллюлярный рак, неходжкинскую лимфому, рак почки, лимфому Ходжкина, мезотелиому, рак яичников, мелкоклеточный рак легких, рак пищевода, анальный рак, рак желчных путей, колоректальный рак, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак слюнных желез, рак предстательной железы или глиобластому.

42. Способ по п.41, где рак представляет собой рак молочной железы, который представляет собой тройной негативный рак молочной железы или ER+/HER2– рак молочной железы.

43. Способ по п.41, где рак представляет собой неходжкинскую лимфому, которая представляет собой первичную медиастинальную В–клеточная лимфому или диффузную крупноклеточную В–клеточную лимфому.

44. Способ по п.40, где рак представляет собой солидную опухоль с высокочастотной микросателлитной нестабильностью (MSI–H) или с дефицитом репарации неспаренных оснований.

45. Способ по п.41, где рак представляет собой немелкоклеточный рак легких,

меланому, лимфому Ходжкина, уротелиальный рак, рак головы и шеи, рак желудка или MSI-H рак.

46. Способ по п.41, где рак представляет собой метастатический немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

47. Способ по п.46, где пациент имеет опухоль с высокой экспрессией PD-L1 [(балл пропорции опухоли (TPS) $\geq 50\%$)] и ранее не получал лечение платина-содержащей химиотерапией.

48. Способ по п.46, где пациент имеет опухоль с экспрессией PD-L1 (TPS $\geq 1\%$) и ранее получал лечение платина-содержащей химиотерапией.

49. Способ по п.46, где пациент имеет опухоль с экспрессией PD-L1 (TPS $\geq 1\%$) и ранее не получал лечение платина-содержащей химиотерапией.

50. Способ по любому из пп. 46–49, где опухоль пациента не имеет геномных aberrаций EGFR или ALK.

51. Способ по любому из пп. 46–50, где способ дополнительно включает введение пациенту пеметрекседа и карбоплатина.

52. Способ по любому из пп. 39–51, где эффективное количество включает дозу антитела к человеческому PD-1, выбранную из группы, состоящей из приблизительно 1,0, 3,0 и 10 мг/кг массы тела пациента.

53. Способ по любому из пп. 39–51, где эффективное количество композиции антитела к человеческому PD-1 включает дозу антитела к человеческому PD-1 200 мг.

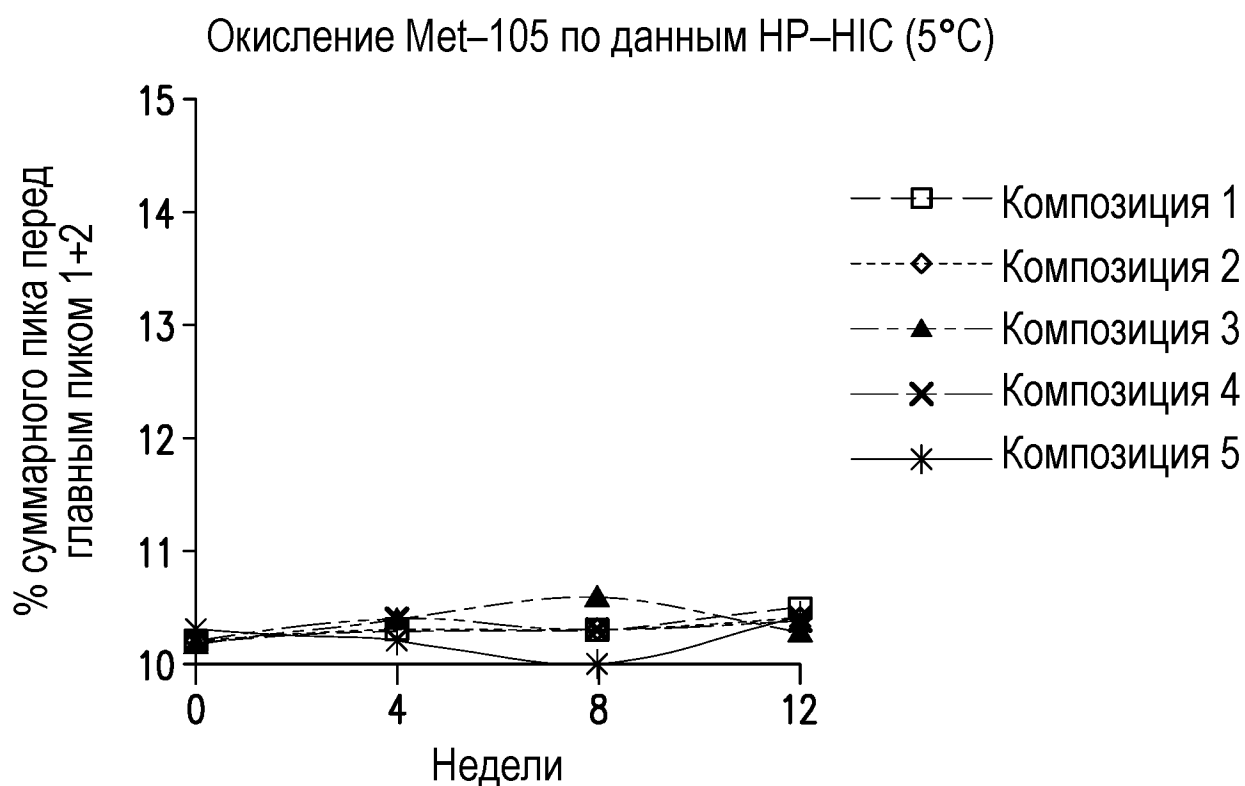
54. Способ по любому из пп. 39–51, где композицию антитела к человеческому PD-1 вводят путем подкожного введения.

55. Способ по любому из пп. 39–51, где композицию антитела к человеческому PD-1 вводят путем внутривенного введения.

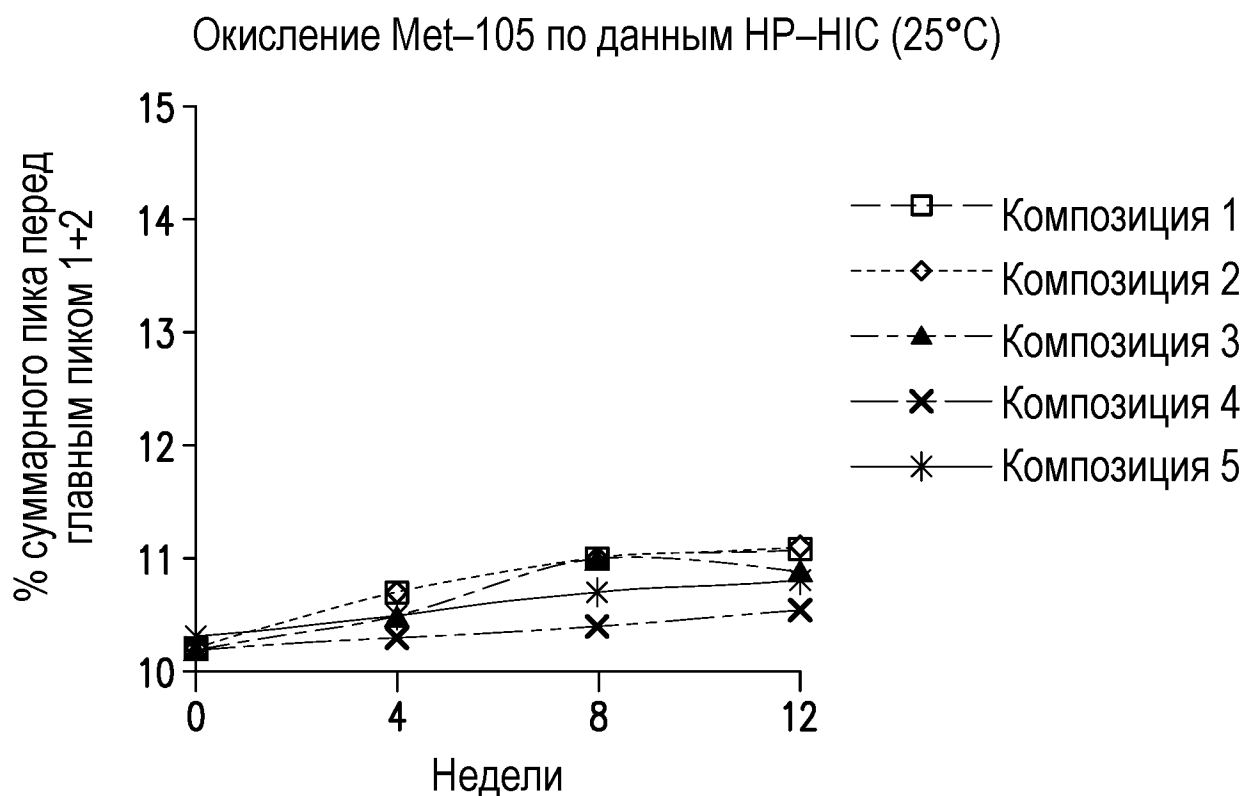
56. Применение композиции антитела к человеческому PD-1 по любому из пп. 1–38 для лечения рака у пациента-человека.

57. Применение по п.56, где рак представляет собой меланому, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, уротелиальный рак, рак молочной железы, рак желудка, аденокарциному гастроэзофагеального перехода, множественную миелому, гепатоцеллюлярный рак, неходжкинскую лимфому, рак почки, лимфому Ходжкина, мезотелиому, рак яичников, мелкоклеточный рак легких, рак пищевода, анальный рак, рак желчных путей, колоректальный рак, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак слюнных желез, рак предстательной железы, глиобластому или MSI-H рак.

ФИГ.1А

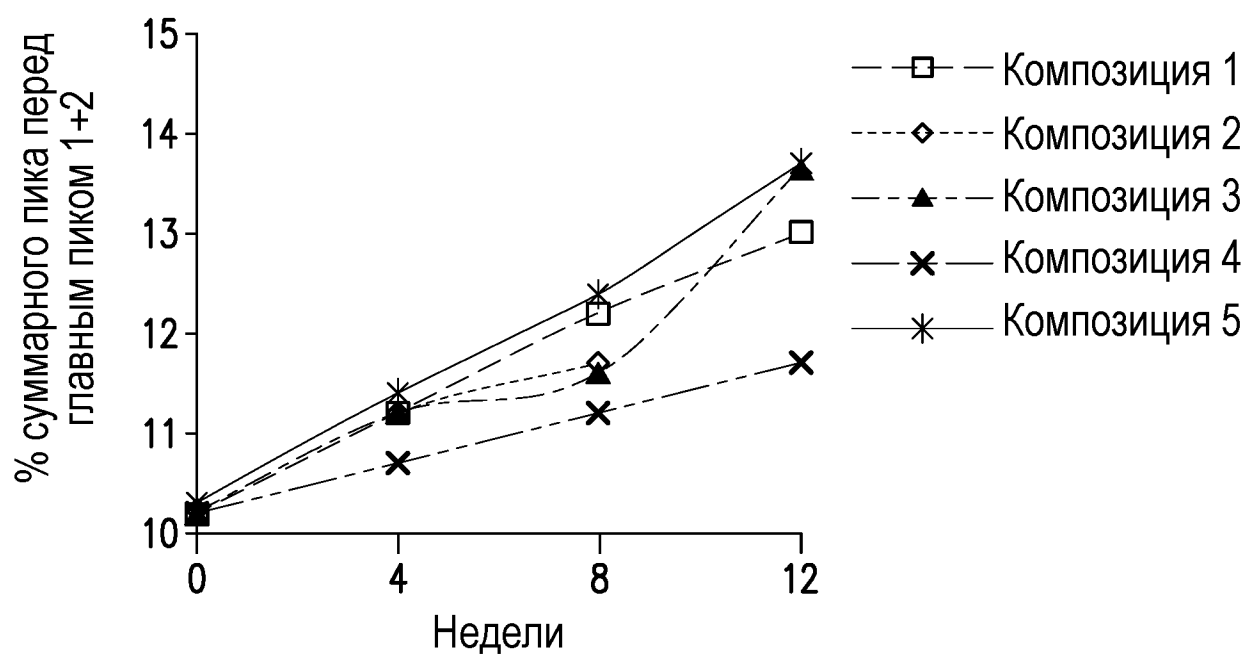


ФИГ.1В

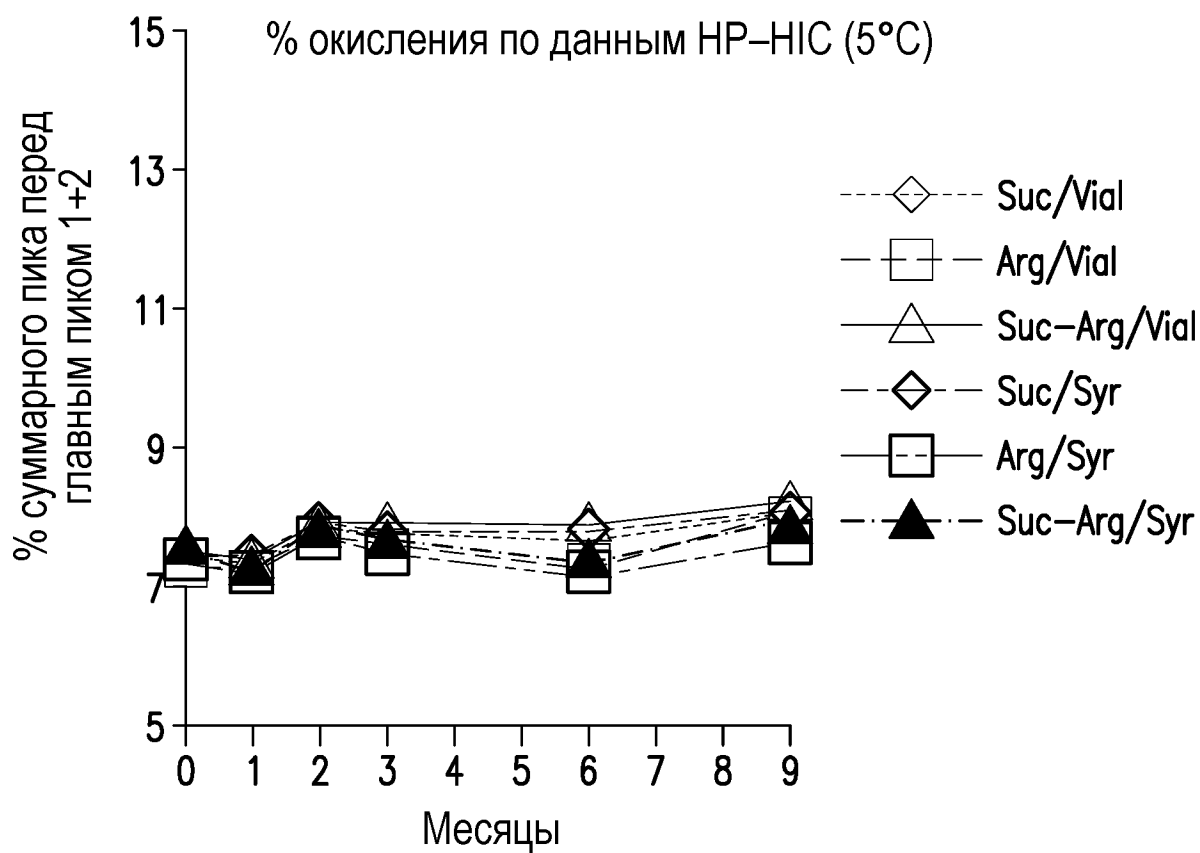


ФИГ.1С

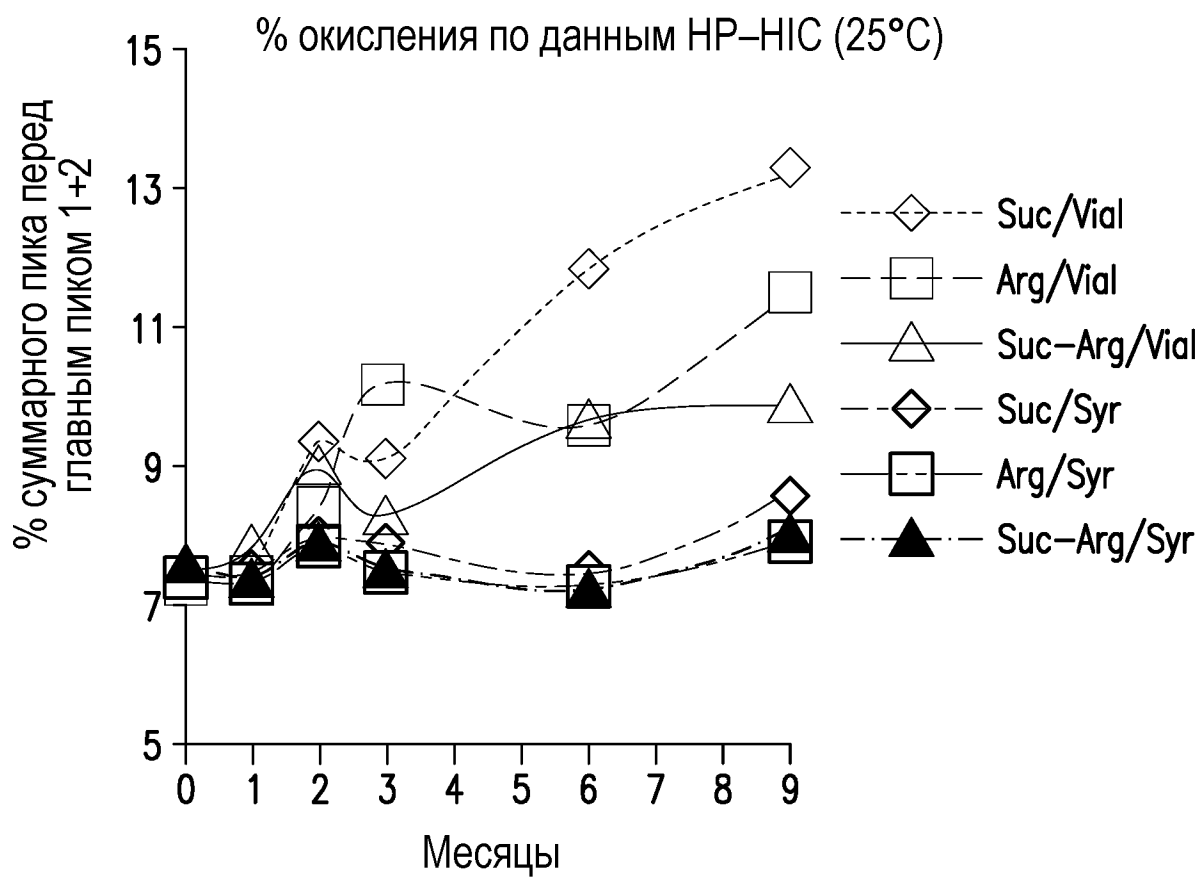
Окисление Met-105 по данным НР-НМС (40°C)



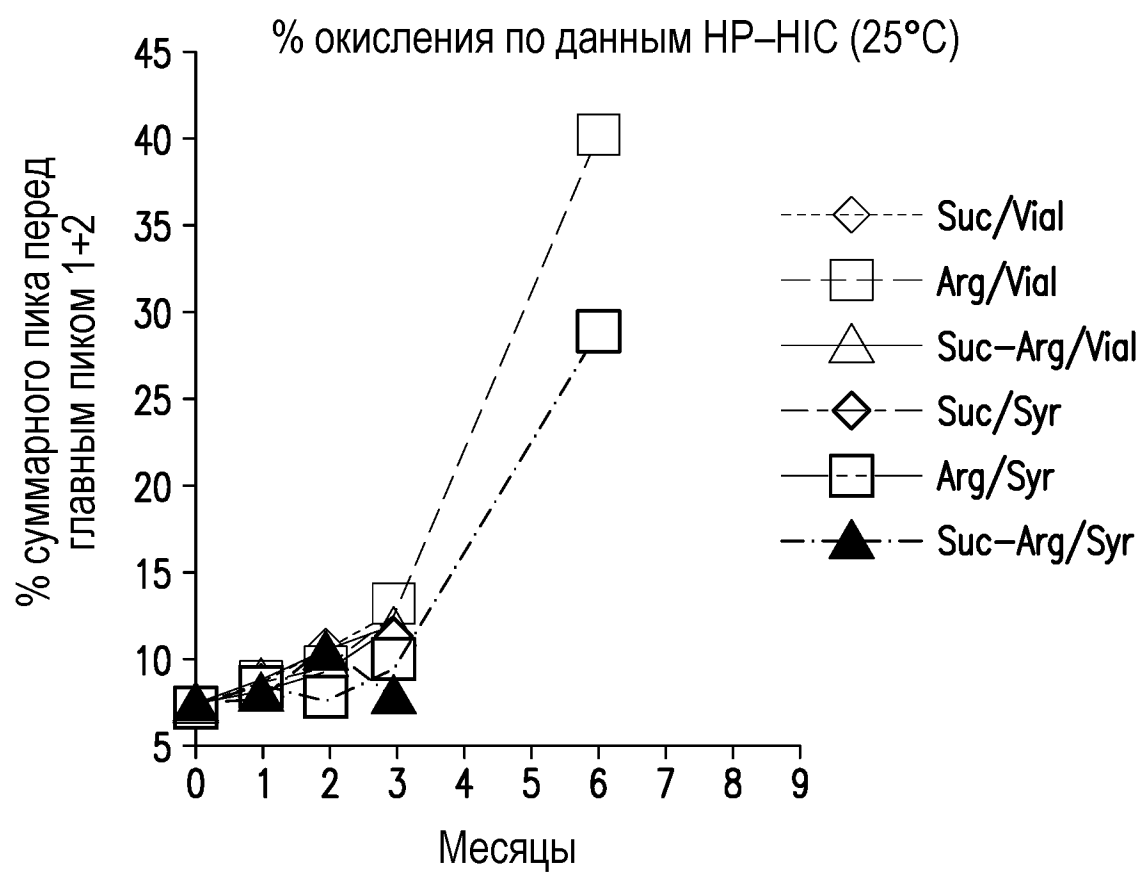
ФИГ.2А



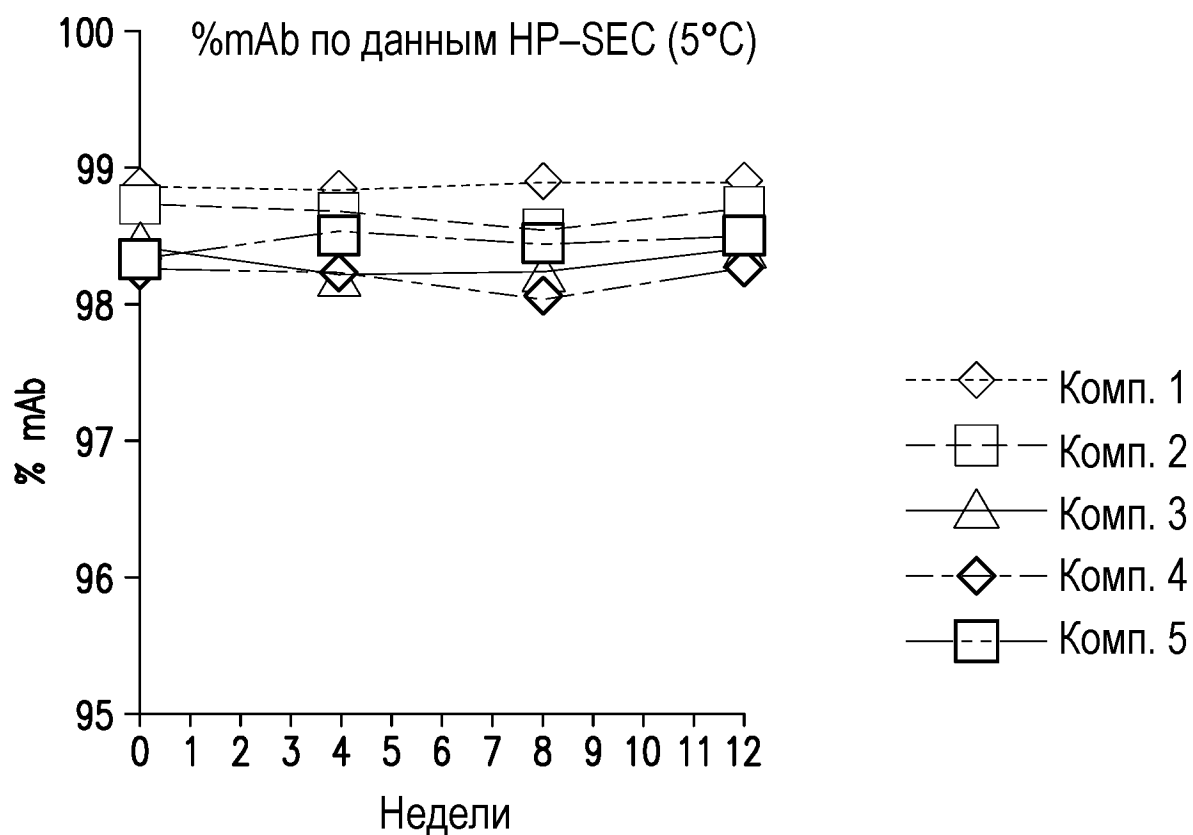
ФИГ.2В



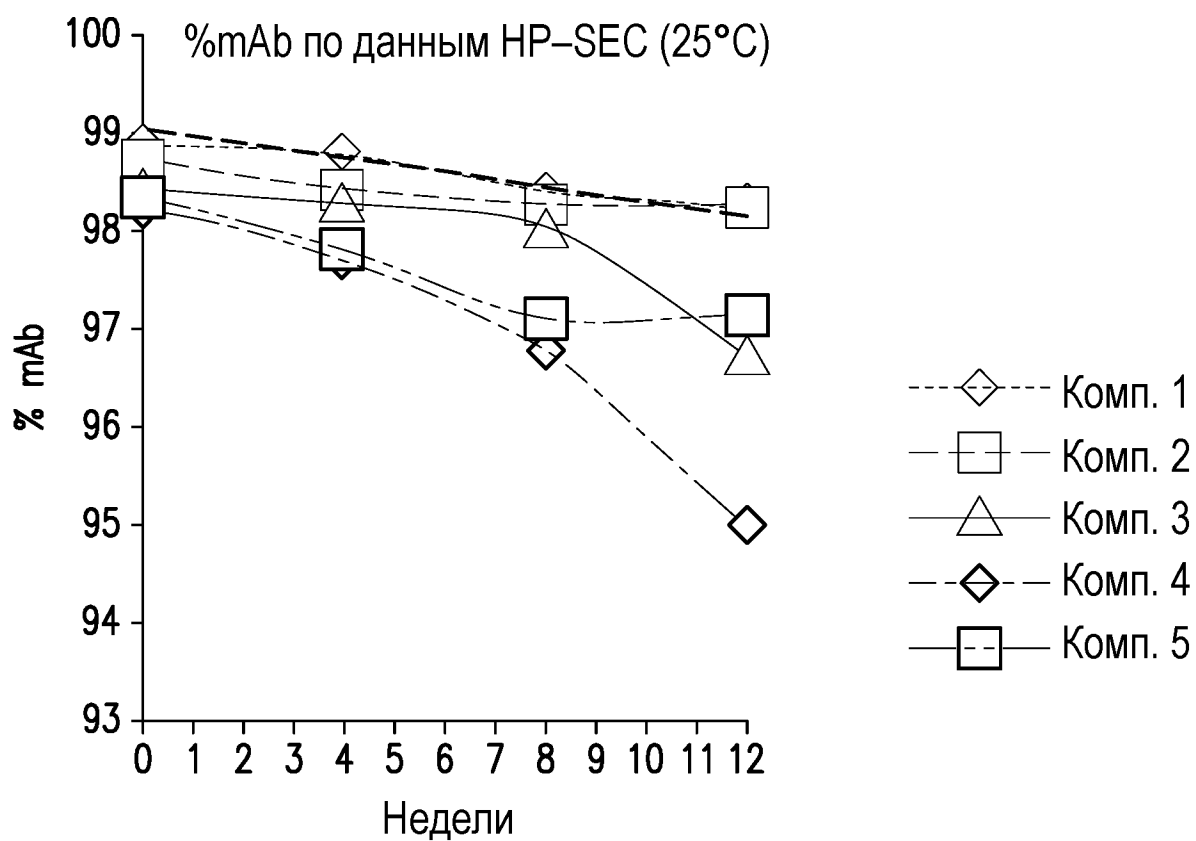
ФИГ.2С



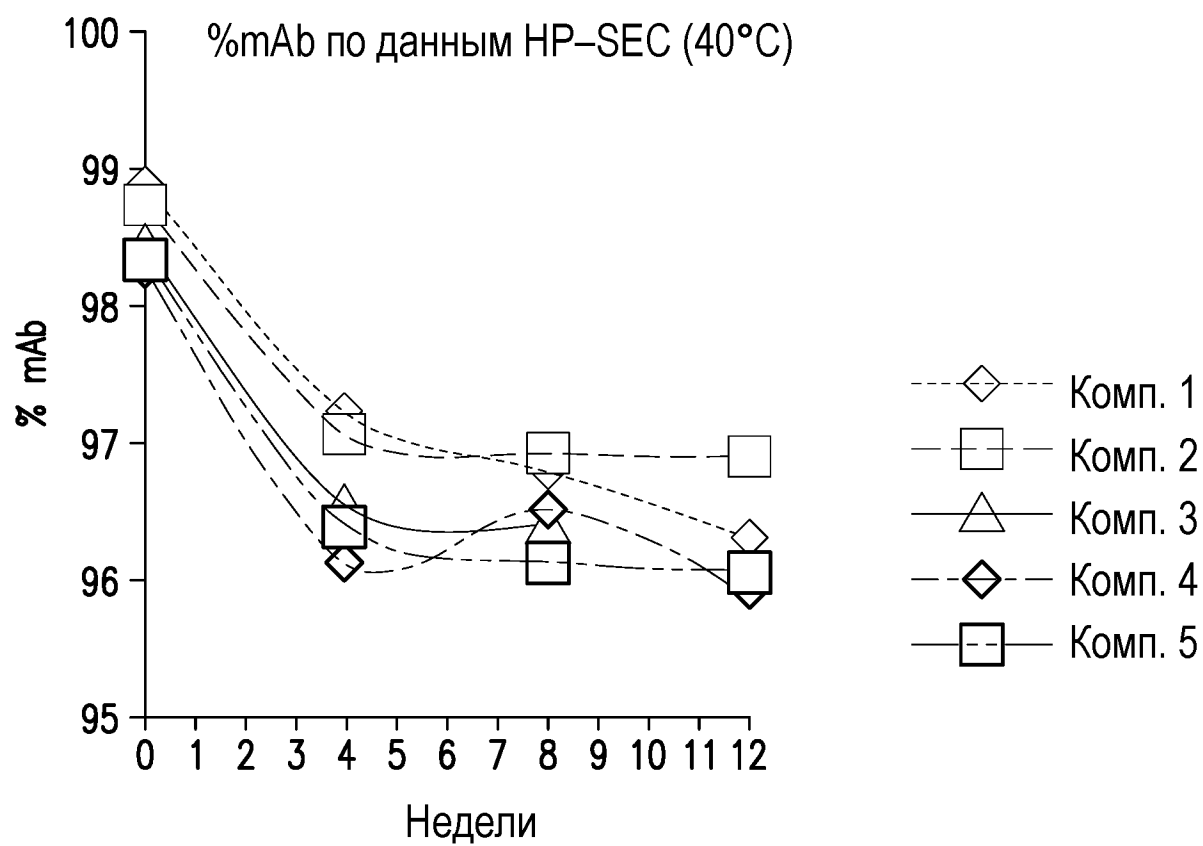
ФИГ.3А



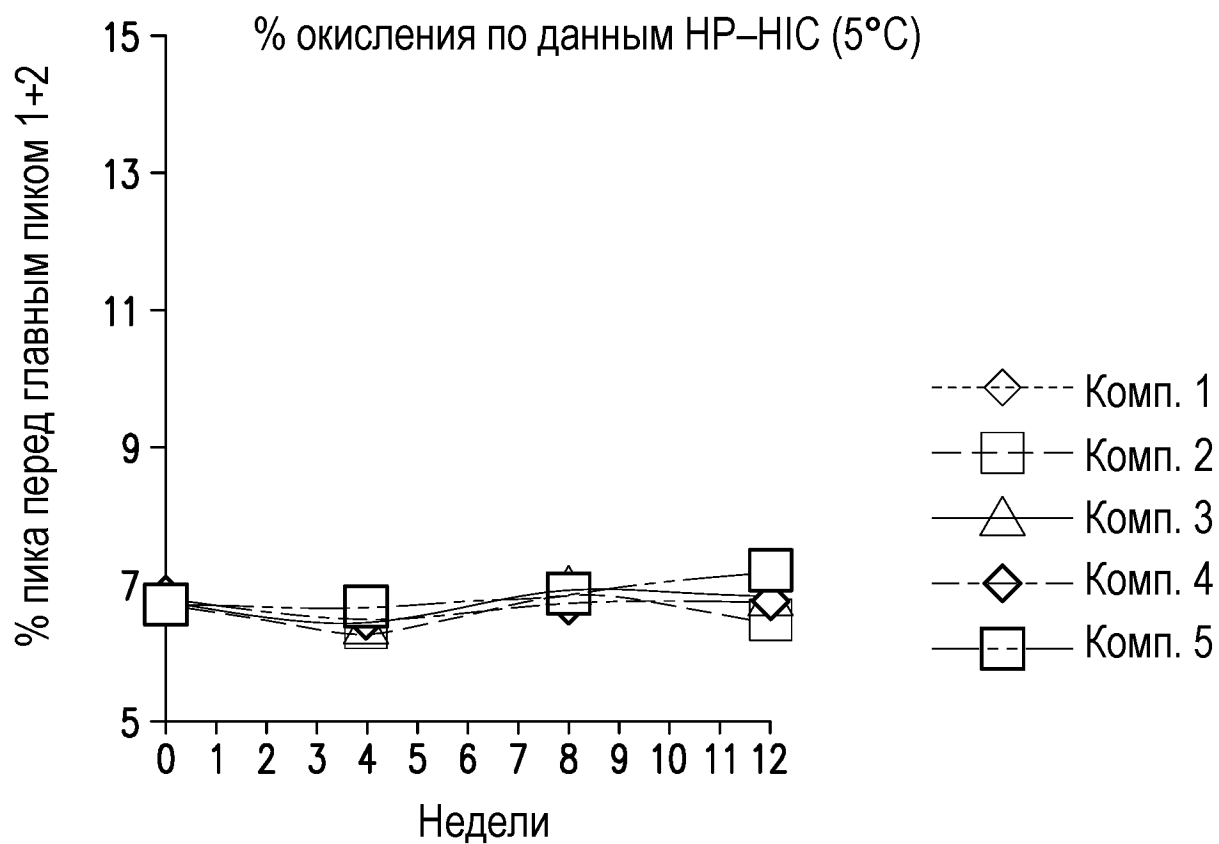
ФИГ.3В



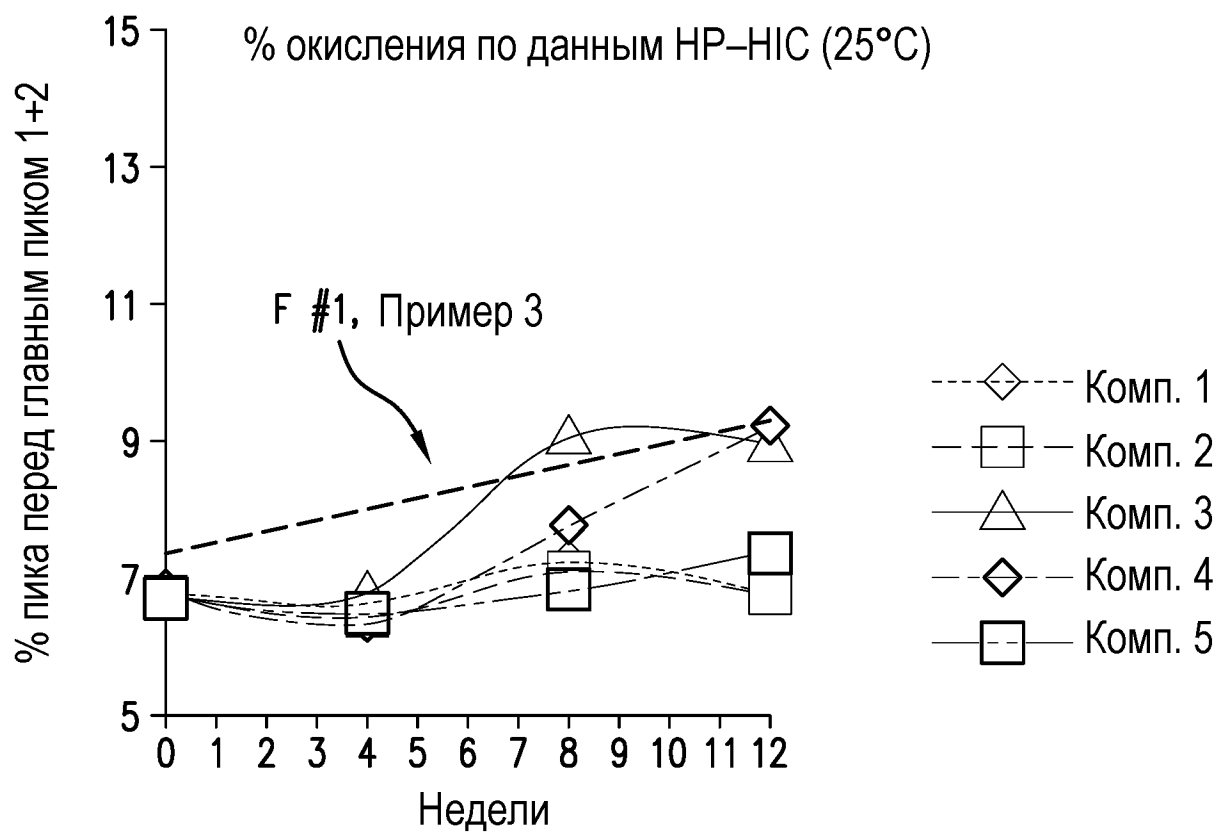
ФИГ.3С



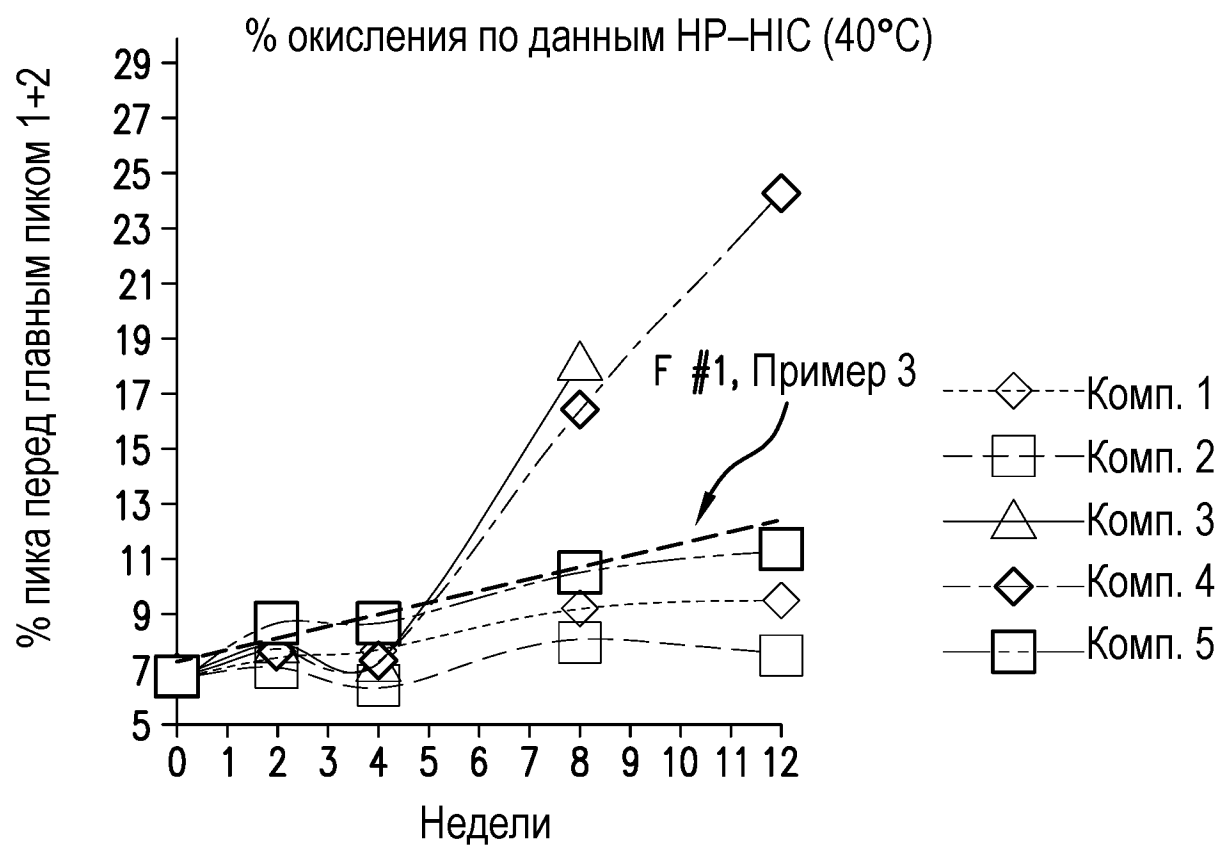
ФИГ.4А



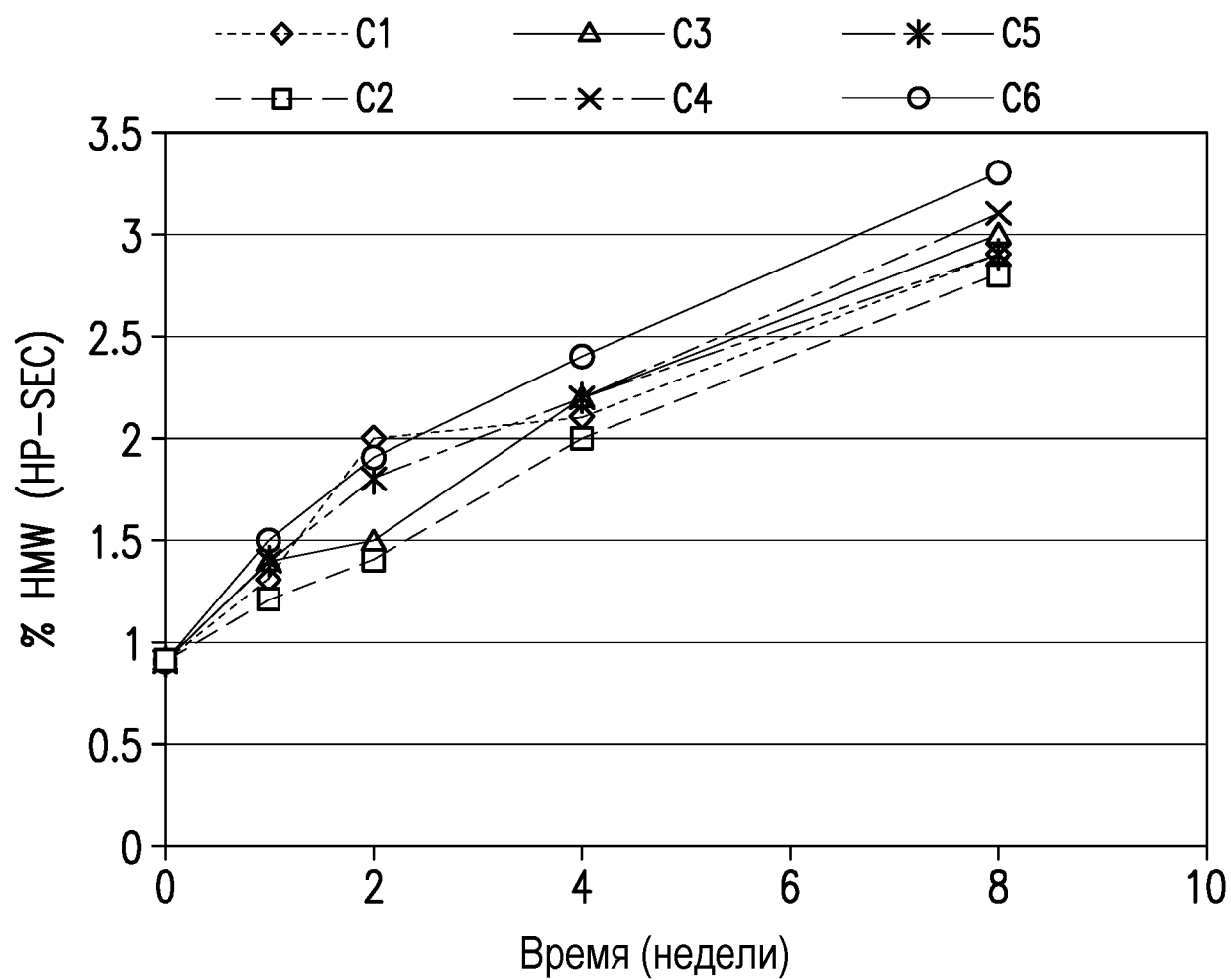
ФИГ.4В



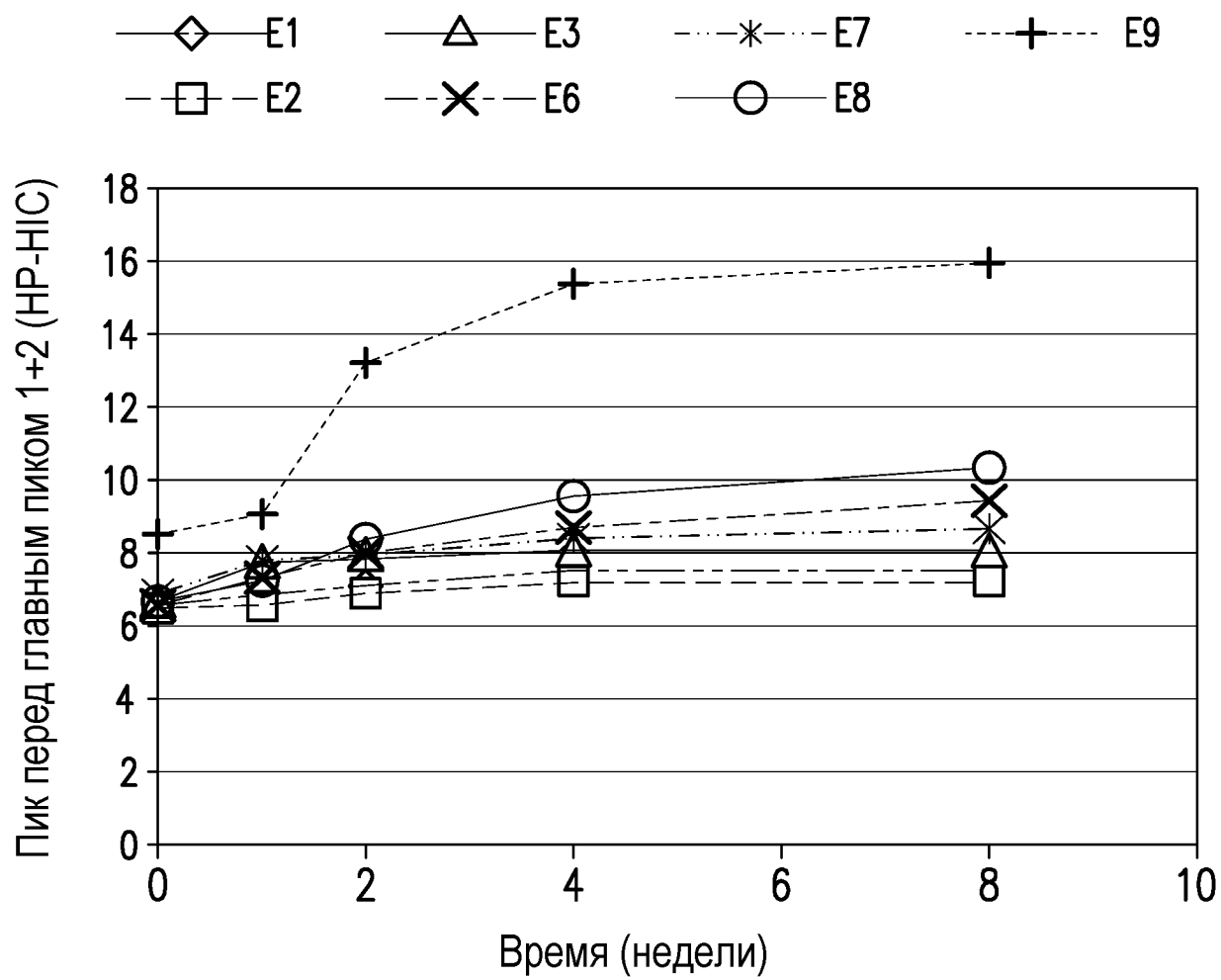
ФИГ.4С



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

