

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090350** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.06.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.23

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) **62/536,028**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.07.24**

Тан Сяолин, Людвиг Дэвид Бретт

(33) **US**

(US)

(86) **PCT/US2018/043238**

(74) Представитель:

(87) **WO 2019/023102 2019.01.31**

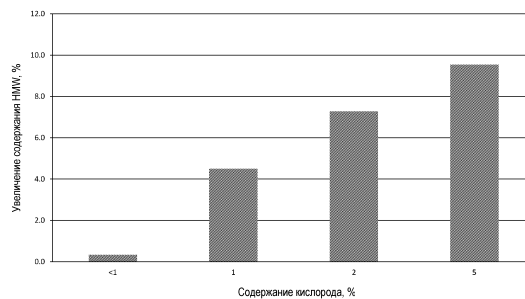
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) В настоящем изобретении предложены фармацевтические продукты, включающие герметичные контейнеры, содержащие стабильный жидкий рекомбинантный белок, такой как антигенсвязывающий белок, причем композиция и газ в свободном объеме содержат меньше 5% кислорода, и способы их производства. Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ контроля уровней кислорода в свободном объеме фармацевтического продукта в герметичном контейнере, включающем стабильную жидкую композицию рекомбинантного белка и газ в свободном объеме, содержащий меньше 21% кислорода.



A1

202090350

202090350

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561127EA/025

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к жидким композициям антител и к способам получения таких композиций путем минимизации и/или контроля уровня окисляющих газов в свободном объеме контейнеров, в которых такие композиции содержатся и хранятся до введения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Терапевтические средства на основе антител, включая моноспецифичные и биспецифичные антитела, продолжают разрабатывать для лечения различных заболеваний и состояний, включая лечение онкологических заболеваний и аутоиммунных нарушений. Активность антител возросла с улучшением процесса получения молекул антител, направленных против конкретных мишеней. Независимо от хранения в высоких концентрациях для введения в малых объемах или в более низких концентрациях для высокоактивных терапевтических средств, молекулы антител могут быть подвержены окислению при наполнении и хранении жидких композиций в контейнерах с лекарственными средствами, таких как флаконы, и их введении с помощью шприцев. Важность сохранения стабильной композиции для сведения к минимуму потерь биологически активного средства в результате окисления или других процессов разложения была подчеркнута на Международной конференции по согласованию технических требований для регистрации фармацевтических препаратов для медицинского применения (ICH). В соответствии со спецификациями ICH (Q6A и Q6B), если лекарственное вещество не разлагается в конкретной композиции и при определенных условиях хранения, предполагаемых при применении нового лекарственного средства, как продемонстрировано с помощью соответствующей аналитической методики, то исследования на присутствие продуктов разложения могут быть уменьшены или исключены по согласованию с регулирующими органами.

[0003] Применение азота или инертных газов (например, аргона) для замены "воздуха" в свободном объеме контейнеров с лекарственным средством обсуждалось в уровне техники. В EP1174148 обсуждается получение композиции Fab-фрагмента в концентрации 2 мг/мл, в которой свободный объем для газа в каждом флаконе продувают азотом в повторных циклах в камере для лиофилизации лабораторного масштаба (т.е. не соответствующей стандартам Надлежащей производственной практики (GMP)). В EP1174148 не указана концентрация кислорода в газе, содержащемся в свободном объеме после продувки азотом, и не приведены указания по контролю содержания кислорода в свободном объеме до заданного целевого уровня, при этом наблюдали значительное процентное увеличение содержания примесей с высокой молекулярной массой (HMW) в исследовании стабильности при хранении в условиях ускоренного разложения (например,

40°C в течение 1 месяца). В нескольких примерах увеличение примесей НМВ после 1 месяца при 40°C превышало 300% (Таблица 1), тогда как хранение при 40°C в течение трех месяцев приводило к увеличению содержания примесей НМВ более чем в 14 раз (Таблица 4). Аналогичным образом в US 2016/0129028 обсуждается применение процесса создания слоя азота для сохранения стабильности полисахаридов, а в US 2012/0183531 обсуждается снижение уровня или замена кислорода в свободном объеме белковых лекарственных препаратов с применением азота или инертных газов для предотвращения или ингибирования окрашивания в желтый цвет в результате окисления гистидинсодержащих буферов. В фармацевтической промышленности существует потребность в способах гарантированного снижения процентного показателя или влияния разложения лекарственных препаратов вследствие окисления.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В первом аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок (например, антигенсвязывающий белок или антитело) в жидкой композиции и свободный объем, включающий газ, где газ содержит меньше 5% кислорода по объему, и рекомбинантный белок является стабильным в течение по меньшей мере 28 дней в случае хранения при 45°C. В данном контексте стабильный в течение по меньшей мере 28 дней относится к увеличению процентного содержания примесей с высокой молекулярной массой не больше чем на 2% в течение указанного периода.

[0005] В некоторых случаях газ содержит не больше 2% кислорода по объему, не больше 1% кислорода по объему, меньше 1% кислорода по объему или не больше 0,1% кислорода по объему.

[0006] В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция фармацевтического продукта содержит рекомбинантный белок (например, антигенсвязывающий белок) в концентрации приблизительно от 2 мг/мл до 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция фармацевтического продукта содержит рекомбинантный белок (например, антигенсвязывающий белок) в концентрации 150-200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция фармацевтического продукта содержит рекомбинантный белок (например, антигенсвязывающий белок) в концентрации меньше 10 мг/мл, меньше 5 мг/мл или меньше 2 мг/мл.

[0007] В некоторых вариантах осуществления фармацевтический продукт содержит рекомбинантный белок, который является стабильным в течение по меньшей мере трех месяцев в случае хранения при 45°C, где стабильный в течение по меньшей мере трех месяцев относится к увеличению процентного содержания примесей с высокой молекулярной массой не больше чем на 10% в течение указанного периода. В некоторых случаях стабильность рекомбинантного белка относится к увеличению процентного содержания примесей с высокой молекулярной массой не больше чем на 5% в течение указанного периода или к увеличению процентного содержания примесей с высокой

молекулярной массой меньше чем на 1% в течение указанного периода.

[0008] В другом аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок (например, антигенсвязывающий белок или антитело) в жидкой композиции и свободный объем, включающий газ, где газ содержит меньше 1% кислорода по объему, и рекомбинантный белок является стабильным в течение по меньшей мере 31 месяца в случае хранения при 5°C. В данном контексте стабильный в течение по меньшей мере 31 месяца относится к изменению процентного содержания вариантов с основным зарядом не больше чем на 10% в течение указанного периода.

[0009] В другом аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок (например, антигенсвязывающий белок) в жидкой композиции и свободный объем, включающий газ, где газ содержит меньше 1% кислорода по объему. В некоторых вариантах осуществления газ содержит не больше 0,1% кислорода по объему. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный белок присутствует в жидкой композиции в концентрации меньше 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный белок присутствует в жидкой композиции в концентрации приблизительно 2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный белок присутствует в жидкой композиции в концентрации меньше 2 мг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл или приблизительно 1 мг/мл.

[0010] В различных вариантах осуществления фармацевтического продукта, обсуждаемого выше или в настоящем документе, рекомбинантный белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В некоторых случаях антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. В некоторых случаях антитело представляет собой моноспецифичное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифичное антитело.

[0011] В некоторых случаях контейнером фармацевтического продукта является флакон. В некоторых вариантах осуществления флакон включает пробку, такую как резиновая пробка, включающая ножку для лиофильной сушки. В некоторых случаях фармацевтический продукт затем вводят с помощью шприца или переносят в шприц или инъекционное устройство.

[0012] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения фармацевтического продукта в герметичном контейнере, содержащем рекомбинантный белок (например, антигенсвязывающий белок или антитело) в жидкой композиции и свободный объем, включающий газ с пониженным содержанием кислорода, где способ включает: (a) загрузку одного или более контейнеров, содержащих жидкую композицию рекомбинантного белка, в вакуумную камеру при атмосферном давлении; (b) вакуумирование камеры при первом давлении от 0,05 до 0,15 бар; (c) продувку камеры неокисляющим газом при втором давлении от 800 мбар до 1000 мбар; и (d) укупорку одного или более контейнеров внутри герметично закрытой вакуумной камеры, где

способ осуществляют при температуре в пределах 15-25°C, и герметичный контейнер содержит газ в свободном объеме с содержанием кислорода меньше 5% по объему.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает повтор этапов (b) и (c) один или более раз перед укупоркой одного или более контейнеров.

[0014] В некоторых случаях первое давление составляет приблизительно 0,1 бар, и/или второе давление составляет от 0,2 бар до 0,1 бар или от 0,1 бар до 0,12 бар. В некоторых вариантах осуществления давление в камере измеряют с помощью вакуумметра Пирани. В некоторых вариантах осуществления температура составляет приблизительно 19°C.

[0015] В других вариантах осуществления пробка может быть частично укупорена до введения инертного газа, затем полностью укупорена и герметизирована после процесса введения инертного газа. В некоторых случаях герметичный контейнер включает газ в свободном объеме с меньше чем 2% кислорода по объему, меньше чем 1% кислорода по объему или не больше чем 0,1% кислорода по объему.

[0016] В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция в фармацевтическом продукте, изготовленном согласно способам, обсуждаемым выше или в настоящем документе, содержит рекомбинантный белок в концентрации от 2 мг/мл до 200 мг/мл. В других вариантах осуществления жидкая композиция в фармацевтическом продукте, изготовленном согласно способам, обсуждаемым выше или в настоящем документе, содержит рекомбинантный белок в концентрации 150-200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция в фармацевтическом продукте, изготовленном согласно способам, обсуждаемым выше или в настоящем документе, содержит рекомбинантный белок в концентрации меньше чем 10 мг/мл, меньше чем 5 мг/мл или меньше чем 2 мг/мл.

[0017] В различных вариантах осуществления способов, обсуждаемых выше или в настоящем документе, рекомбинантный белок представляет собой антигенсвязывающий белок или антитело. В некоторых случаях антитело представляет собой моноспецифичное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифичное антитело.

[0018] В некоторых случаях контейнер фармацевтического продукта, применяемый в способах настоящего изобретения, является флаконом. В других вариантах осуществления флакон включает резиновую пробку для лиофилизованного продукта с ножкой для лиофильной сушки (которая может быть частично укупорена до введения инертного газа, затем полностью укупорена и герметизирована после процесса введения инертного газа).

[0019] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ контроля содержания кислорода в свободном объеме герметичного контейнера, содержащего жидкую фармацевтическую композицию, где способ включает: (a) определение требуемого конечного содержания кислорода в свободном объеме герметичного

контейнера; (b) вычисление конечного % содержания кислорода после первого цикла снижения содержания кислорода согласно уравнению (I):

$$\%O_{2, \text{конец}} = \left(\frac{P_{\text{вакуума}}}{P_{\text{продувки}}} \right) * \%O_{2, \text{начало}}$$

(I)

где $\%O_{2, \text{начало}}$ является % содержанием кислорода в начале первого цикла, $P_{\text{вакуум}}$ является давлением при вакуумировании, применяемым в первом цикле снижения содержания кислорода, $P_{\text{продувки}}$ является давлением выше $P_{\text{вакуум}}$, но меньше 1 бар и $\%O_{2, \text{конец}}$ является % содержанием кислорода в конце первого цикла; (c) необязательно применение уравнения (I) к дополнительным циклам, где $\%O_{2, \text{начало}}$ является % содержанием кислорода в конце предыдущего цикла, пока не будет достигнуто требуемое конечное содержание кислорода; и (d) изготовление фармацевтического продукта в герметичном контейнере при: (i) выполнении одного или более циклов снижения содержания кислорода путем вакуумирования негерметизированного контейнера в вакуумной камере при $P_{\text{вакуум}}$, где $P_{\text{вакуум}}$ является давлением от 0,05 бар до 0,15 бар, и продувки негерметизированного контейнера в вакуумной камере неокисляющим газом при давлении продувки от 800 мбар до 1000 мбар; и (ii) герметизацию контейнера в герметичной камере лиофильной сушки.

Если требуемое % содержание кислорода в свободном объеме над фармацевтическим продуктом является низким (например, ниже чем приблизительно 2%), то для того, чтобы достигнуть целевого уровня содержания кислорода, выполняют множество циклов снижения содержания кислорода. При этом % содержание кислорода после множества циклов снижения содержания кислорода с использованием одного и того же вакуумметрического давления и давления продувки определяют согласно уравнению (II):

$$\%O_{2, \text{конечное}} = \left(\frac{P_{\text{вакуум}}}{P_{\text{продувки}}} \right)^n * \%O_{2, \text{начало}}$$

(II)

где $\%O_{2, \text{начало}}$ является % содержанием кислорода в начале первого цикла, $P_{\text{вакуум}}$ является вакуумметрическим давлением, применяемым в цикле снижения содержания кислорода, $P_{\text{продувки}}$ является давлением продувки инертным газом, и $\%O_{2, \text{конечное}}$ является % содержанием кислорода в конце множества циклов; и n является количество полных циклов снижения содержания кислорода, примененных к продукту. Таким образом, количество циклов снижения содержания кислорода, требуемое для достижения конечного уровня кислорода в свободном объеме флакона, получают при решении уравнения (II).

[0020] В различных вариантах осуществления способов, обсуждаемых выше или в настоящем документе, неокисляющий газ выбран из группы, состоящей из азота, аргона, гелия, ксенона, неона, криптона и радона. В одном варианте осуществления

неокисляющим газом является азот. В одном варианте осуществления неокисляющим газом является аргон.

[0021] Различные варианты осуществления, обсуждаемые выше или в настоящем документе, могут быть объединены любым образом в соответствии с настоящим изобретением. Другие варианты осуществления станут очевидными при ознакомлении со следующим подробным описанием.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0022] На Фигуре 1 показано изменение % содержания вариантов с основным зарядом согласно КОХ-ВЭЖХ в зависимости от содержания кислорода в свободном объеме над жидкой композицией биспецифичного антитела после 31 месяца хранения при 5°C.

[0023] На Фигуре 2 показано увеличение % содержания примесей с высокой молекулярной массой в зависимости от содержания кислорода в свободном объеме над жидкой композицией биспецифичного антитела после 28 дней хранения при 45°C с использованием слоя азота в соответствии со способами, обсуждаемыми в настоящем документе.

[0024] На Фигуре 3 показано увеличение % содержания примесей с высокой молекулярной массой в зависимости от содержания кислорода в свободном объеме над жидкой композицией биспецифичного антитела после 3 месяцев хранения при 45°C с использованием слоя азота в соответствии со способами, обсуждаемыми в настоящем документе.

[0025] На Фигуре 4 показано увеличение % содержания примесей с высокой молекулярной массой в зависимости от содержания кислорода в свободном объеме над жидкой композицией биспецифичного антитела после 3 месяцев хранения при 45°C с использованием слоя аргона в соответствии со способами, обсуждаемыми в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0026] Перед описанием настоящего изобретения, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями эксперимента, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0027] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно известно специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение. При использовании в настоящем документе термин "приблизительно", в случае его использования в отношении конкретного приведенного числового значения, означает, что такое значение может отличаться от приведенного значения не больше чем на 1%.

Например, при использовании в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[0028] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на патент и непатентные публикации, указанные в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

Определения

[0029] Предполагается, что термин "рекомбинантный белок" при использовании в настоящем документе включает все белки, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных методов, такие как белки, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина.

[0030] Термин "антигенсвязывающая молекула" или "антигенсвязывающий белок" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, в том числе, например, моноспецифичных и биспецифичных антител.

[0031] Термин "антитело" при использовании в настоящем документе означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, включающий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается или взаимодействует с конкретным антигеном. Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи включает один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), с промежуточными областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR-области антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR-областей.

[0032] Термин "антитело" при использовании в настоящем документе также

включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и подобные термины, используемые в настоящем документе, включают любой природный, получаемый при ферментативной обработке, синтетический или полученный с помощью методов генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител при использовании любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, включающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать химическим манипуляциям или манипуляциям с использованием методов молекулярной биологии, например, с целью расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот, и т.д.

[0033] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-перевитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в настоящем документе.

[0034] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, включает по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно включает по меньшей мере одну CDR, которая примыкает или находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих V_H домен, ассоциированный с V_L доменом, V_H и V_L домены могут быть расположены друг относительно друга в любой подходящей конфигурации. Например, переменная область может быть димерной и содержать V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L димеры. В альтернативе антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H или V_L домен.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент

антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие примеры конфигураций переменных и константных доменов, которые могут присутствовать в антигенсвязывающем фрагменте антитела настоящего изобретения, включают: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из приведенных выше примерных конфигураций, переменный и константный домены могут быть связаны либо напрямую друг с другом, либо могут быть связаны полноразмерной или неполной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что обеспечивает гибкую или полугибкую связь между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может включать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H или V_L доменами (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

[0036] Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая примеры форматов биспецифичных антител, раскрытые в настоящем документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием стандартных способов, доступных в уровне техники.

[0037] Предполагается, что термин "человеческое антитело" при использовании в настоящем документе включает антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR-областях и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в настоящем документе, не предусматривает включение антител, в которых CDR-последовательности, полученные из зародышевой линии млекопитающего другого вида, такого как мышь, были перевиты на человеческие каркасные последовательности.

[0038] Антитела согласно изобретению в некоторых вариантах осуществления могут быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело" при использовании в настоящем документе предусматривает включение всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных методов, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описанные ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описанные ниже), антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, полученные из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергнуты мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования животного, трансгенного по человеческим Ig последовательностям, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H и V_L областей рекомбинантного антитела являются последовательностями, которые, несмотря на то, что они были получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и являются родственными им, в естественных условиях могут не существовать в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[0039] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, что связано с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию с массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, при этом образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитела). Эти формы очень сложно разделять, даже после аффинной очистки.

[0040] Частота присутствия второй формы в различных интактных изоформах IgG обусловлена, но не ограничивается, структурными различиями, связанными с изоформой шарнирной области антитела. Замена одной аминокислоты в шарнирной области IgG4 человека может значительно снизить возникновение второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнирной области IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной области, C_H2 или C_H3 области, которые могут требоваться, например, в процессе получения для повышения выхода нужной формы антитела.

[0041] Антитела согласно изобретению могут быть выделенными антителами. "Выделенное антитело" при использовании в настоящем документе означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или удалено по меньшей мере от одного компонента его окружения. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере от одного компонента организма или от ткани или клетки, в которой антитело существует в естественном состоянии или продуцируется в естественном состоянии, является "выделенным антителом" в рамках настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела являются антителами, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

[0042] Настоящее изобретение также включает одноплечевые антитела, которые связывают специфический антиген. При использовании в настоящем документе "одноплечевое антитело" означает антигенсвязывающую молекулу, включающую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела.

[0043] Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь больше одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут производить разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп формируется при пространственном совмещении аминокислот из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, формируемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых случаях эпитоп может включать остатки сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

[0044] Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность нуклеотидной последовательности присутствует по меньшей мере приблизительно в 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, согласно измерению с помощью любого известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, обладающая существенной идентичностью с референсной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый референсной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0045] Применительно к полипептидам термин "существенное подобие" или "по существу подобный" означает, что две пептидные последовательности при их оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, при использовании штрафа за введение пропуска по умолчанию, обладают идентичностью последовательности по меньшей мере 95%, даже более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" является такой заменой, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена не приводит к существенному изменению функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень подобия могут быть скорректированы в сторону увеличения, чтобы учесть консервативный характер замены. Способы внесения такой поправки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, публикацию Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенную в настоящий документ посредством отсылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи имеют цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативе консервативная замена является любым изменением, имеющим положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в публикации Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в настоящий документ посредством отсылки. "Умеренно консервативная" замена является любым изменением, имеющим неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0046] Подобие последовательности для полипептидов, которое также именуется идентичностью последовательности, как правило, измеряют при использовании программного обеспечения для анализа последовательности. Программное обеспечение для анализа белков сравнивает подобные последовательности при использовании показателей подобия, определенных для различных замен, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. Например, пакет программ GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут использоваться с параметрами по умолчанию для определения гомологии

последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и соответствующим мутеином. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать при помощи FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает построение выравнивания и получение процента идентичности последовательностей для областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, публикации Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, которые включены в настоящий документ посредством отсылки.

Фармацевтические продукты и композиции, включающие рекомбинантный белок

[0047] Фармацевтические продукты согласно настоящему изобретению включают герметичный контейнер (например, флакон), в котором газ в свободном объеме имеет сниженную концентрацию окисляющего газа (например, кислорода) по сравнению с атмосферными концентрациями окисляющего газа. Фармацевтические продукты согласно настоящему изобретению основаны на открытии авторами изобретения способа снижения уровня окисляющих газов в свободном объеме контейнера фармацевтического продукта, который содержит жидкую фармацевтическую композицию рекомбинантного белка (например, антигенсвязывающего белка или антитела). В отличие от стандартных методов лиофилизации, вакуумирование и продувка газа в свободном объеме над жидкой композицией требует точного контроля давления в вакуумной камере, чтобы свести к минимуму или исключить образование пузырьков или разбрызгивание жидкой композиции, что может вызвать потерю материала, или испарение, которое может привести к изменению концентрации действующего вещества (например, антитела). Потеря материала или изменение концентрации представляют особую проблему для композиций с высокой активностью, в которых действующее вещество присутствует в низких концентрациях (например, приблизительно 2 мг/мл). Изменения стабильности композиций с высокой концентрацией представляют проблему, поскольку продукты разложения, образующиеся в результате окисления, могут привести к сложному профилю чистоты/состава и содержания примесей, что может привести к рискам, связанным с иммуногенностью.

[0048] Фармацевтические продукты согласно настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления могут содержать в свободном объеме газ меньше чем с 5% содержанием окисляющего газа (например, кислорода) по объему.

Концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном объеме контейнера фармацевтического продукта в различных вариантах осуществления может составлять меньше 4,5%, меньше 4%, меньше 3,5%, меньше 3%, меньше 2,5%, меньше 2% или меньше 1,5%. В одном варианте осуществления концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном объеме составляет меньше чем приблизительно 1%. В одном варианте осуществления концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном объеме составляет не больше чем приблизительно 0,5%. В одном варианте осуществления концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном объеме составляет не больше чем приблизительно 0,1%. В различных вариантах осуществления концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном объеме контейнера фармацевтического продукта составляет меньше 0,9%, меньше 0,8%, меньше 0,7%, меньше 0,6%, меньше 0,5%, меньше 0,4%, меньше 0,3%, меньше 0,2% или меньше 0,1%. В некоторых случаях концентрация кислорода в газе, содержащемся в свободном объеме, составляет от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,5%. В некоторых случаях концентрация кислорода в газе, содержащемся в свободном объеме, составляет от приблизительно 0,75% до приблизительно 1,25%. В некоторых случаях концентрация кислорода в газе, содержащемся в свободном объеме, составляет от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,15%.

[0049] Контейнер, описанный в настоящем документе, может быть флаконом, колбой и т.д., с достаточным объемом, чтобы вместить требуемое количество фармацевтической композиции и свободный объем. Контейнер может быть изготовлен из различных подходящих материалов, которые обладают инертными свойствами по отношению к фармацевтической композиции, которая должна будет содержаться в нем, и являются непроницаемыми в достаточной степени, чтобы предотвратить утечку фармацевтической композиции или попадание атмосферного воздуха. Примеры таких материалов включают стекло (например, поликарбонатное полистирольное полипропиленовое стекло), полимеры (например, пластик, силиконовые трубки, вулканизированные платиной) и металлы (например, нержавеющую сталь 316L). В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой стеклянный флакон типа 1. Кроме того, контейнер может быть изготовлен в качестве компонента многократного применения или компонента одноразового применения, при необходимости. Различные типы резиновых пробок с ножкой(ами) для лиофильной сушки доступны и подходят для использования с флаконом для лиофильной сушки, подходящим для применения в способах, описанных в настоящем документе. В продаже доступны пробки, включающие одну ножку для лиофильной сушки (с одной ножкой вентиль), 'с двумя ножками' (два отверстия для лиофильной сушки), 'с тремя ножками' (три отверстия для лиофильной сушки), и крестообразные (четыре отверстия для лиофильной сушки) или имеющие еще больше отверстий для лиофильной сушки. Пробка для использования во флаконе в камере лиофильной сушки может быть частично укупорена, при этом отверстие(я) остается открытым во внешнее воздушное пространство во время процесса

введения слоя газа/снижения содержания кислорода, и затем полностью укупорена и герметизирована в соединении с контейнером после одного или более циклов снижения содержания кислорода.

[0050] Фармацевтические продукты согласно настоящему изобретению включают жидкие фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы (например, антитело) согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции согласно изобретению изготавливают с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими веществами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих композиций можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Например, вспомогательные вещества могут включать стабилизатор, буфер, регулятор тоничности, поверхностно-активное вещество, органический растворитель, соль или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор выбран из группы, состоящей из многоатомного спирта, сахара, аминокислоты, неионного поверхностно-активного вещества и их комбинации. В некоторых вариантах регулятор тоничности выбран из группы, состоящей из сахара, аминокислоты, соли и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления буфер выбран из группы, состоящей из гистидина, фосфата, цитрата, сукцината, ацетата, карбоната и их комбинации.

[0051] Концентрация антигенсвязывающих молекул (например, антитела) в жидких композициях может изменяться в зависимости от активности молекул и дозы, которую надлежит вводить из контейнера фармацевтического продукта. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 2 мг/мл. В различных вариантах осуществления концентрация составляет меньше чем приблизительно 25 мг/мл, меньше чем приблизительно 20 мг/мл, меньше чем приблизительно 15 мг/мл, меньше чем приблизительно 10 мг/мл или меньше чем приблизительно 5 мг/мл. В различных вариантах осуществления концентрация антигенсвязывающих молекул в жидкой композиции составляет не больше чем приблизительно 5 мг/мл, не больше чем приблизительно 4 мг/мл, не больше чем приблизительно 3 мг/мл, не больше чем приблизительно 2 мг/мл или не больше чем приблизительно 1 мг/мл. В одном варианте осуществления концентрация составляет меньше чем приблизительно 2 мг/мл. В одном варианте осуществления концентрация составляет меньше чем приблизительно 1 мг/мл.

[0052] Концентрация антигенсвязывающих молекул (например, антитела) в жидких композициях может изменяться в зависимости от объема и дозы, которую надлежит вводить из контейнера фармацевтического продукта. В некоторых случаях концентрация

может изменяться в пределах от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл. В некоторых случаях концентрация может изменяться в пределах от приблизительно 150 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В одном варианте осуществления концентрация составляет больше чем приблизительно 10 мг/мл. В другом варианте осуществления концентрация составляет больше чем приблизительно 50 мг/мл. В другом варианте осуществления концентрация составляет меньше чем приблизительно 100 мг/мл. В одном варианте осуществления концентрация составляет больше чем приблизительно 150 мг/мл.

[0053] Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может изменяться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительную дозу, как правило, вычисляют в зависимости от массы тела или площади тела. В случае применения антигенсвязывающей молекулы настоящего изобретения в терапевтических целях у взрослого пациента, может быть предпочтительно внутривенно вводить антигенсвязывающую молекулу настоящего изобретения обычно в однократной дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения могут регулировать. Эффективные дозы и схемы применения антигенсвязывающей молекулы могут быть определены эмпирически; например, прогресс состояния пациента можно контролировать путем периодической оценки и в соответствии с этим регулировать дозу. Кроме того, межвидовой расчет доз может быть выполнен при использовании методов, известных в уровне техники (например, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[0054] Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению могут доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, шприц-ручка для доставки может применяться при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такая шприц-ручка для доставки может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке для доставки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции, содержащейся внутри картриджа, и опорожнения картриджа, пустой картридж можно легко утилизировать и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовой шприц-ручке для доставки нет сменного картриджа. Вместо этого одноразовая шприц-ручка для доставки поставляется предварительно наполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После

опорожнения резервуара с фармацевтической композицией все устройство утилизируют.

[0055] Жидкие препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Такие препараты для инъекций могут быть изготовлены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены в стерильной водной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций применяют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества, и т.д., которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизующим веществом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. Полученной таким образом формой для инъекций можно наполнять или переносить ее в соответствующий контейнер или устройство (например, ампулу, шприц, инъектор или шприц-ручку).

Стабильность антигенсвязывающих молекул

[0056] Снижение количества окисляющего газа (например, кислорода) в свободном объеме контейнеров фармацевтического продукта согласно настоящему изобретению с преимуществом влияет на стабильность антигенсвязывающих молекул, включенных в состав жидких композиций внутри контейнеров. Окисление является основным путем разложения белковых терапевтических средств, включая антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы. Влияние такого разложения заметно при низких концентрациях, когда любая потеря активного материала оказывает непропорционально большее воздействие на количество действующего вещества, остающегося в композициях после определенного периода хранения. Проявления такого разложения включают увеличение содержания примесей с высокой молекулярной массой (HMW) и изменения процентного содержания вариантов с разными зарядами. Изменения количества или процента примесей HMW могут быть обнаружены с помощью стандартных методов эксклюзионной хроматографии, известных в уровне техники (например, Lu et al., MAbs, 5(1):102-113, 2013). Изменения количества или процентного содержания вариантов с разными зарядами могут быть обнаружены с помощью стандартных методов катионообменной хроматографии, известных в уровне техники (например, Chumsae, et al., Journal of Chromatography B, 850:285-294, 2007). Стабильность антигенсвязывающих молекул в фармацевтических продуктах согласно настоящему изобретению может быть установлена путем измерения изменений количества или процента примесей HMW или вариантов с разными зарядами в зависимости от показателей времени и температуры, соответствующих конкретным условиям хранения. В некоторых случаях условия хранения могут быть сопоставимы с условиями, при которых фармацевтический продукт обычно находится в период между производством и применением. В других случаях условия хранения могут быть условиями ускоренного разложения, предназначенными для

получения за более короткий период времени информации по стабильности при более длительном хранении.

[0057] В различных вариантах осуществления композиций настоящего изобретения антигенсвязывающие молекулы (например, антитела) остаются стабильными в течение по меньшей мере 28 дней в случае хранения при 45°C. Стабильность в данном контексте может относиться, например, к увеличению процентного содержания примесей HMW не больше чем приблизительно на 2% в течение указанного периода хранения. В некоторых случаях увеличение процентного содержания примесей HMW в течение указанного периода хранения составляет не больше чем приблизительно 1,5% или не больше чем приблизительно 1%. В некоторых случаях антигенсвязывающие молекулы остаются стабильными в течение по меньшей мере трех месяцев в случае хранения при 45°C. При таких условиях более длительного хранения стабильность может относиться, например, к увеличению содержания примесей HMW не больше чем приблизительно на 10% в течение указанного периода хранения. В некоторых случаях стабильность при таких условиях более длительного хранения может относиться к увеличению содержания примесей HMW не больше чем приблизительно на 5%, не больше чем приблизительно на 4%, не больше чем приблизительно на 3%, не больше чем приблизительно на 2% или не больше чем приблизительно на 1% в течение указанного периода хранения. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы (например, антитела) остаются стабильными в течение по меньшей мере 31 месяца в случае хранения при 5°C. Стабильность в данном контексте может относиться, например, к изменению процентного содержания вариантов с другим зарядом не больше чем на 10% в течение указанного периода хранения. В некоторых случаях период хранения может составлять 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев или 36 месяцев.

[0058] В процессе производства конкретного терапевтического белкового продукта некоторые показатели качества продукта могут быть определены на основе их потенциального клинического воздействия. Соответствующие показатели качества можно считать критически важными показателями качества (CQA) в зависимости от их потенциального воздействия на чистоту, безопасность и/или эффективность. Содержание примесей с высокой молекулярной массой (HMW) и вариантов с разными зарядами являются всего лишь двумя из многих показателей CQA продукта, которые могут изменяться в течение процесса производства. Контроль изменений этих показателей качества белков осуществляют в течение процесса производства, в том числе после наполнения продуктом контейнера и во время хранения контейнера. Фармацевтический продукт, который чувствителен к окислению, относится к изменениям CQA продукта выше или ниже пороговых значений для конкретного показателя CQA, вызванными повышенными уровнями окисления, которые могут повлиять на чистоту, безопасность и/или эффективность продукта. Фармацевтический продукт, который чувствителен к окислению, также относится к изменениям в продукте, которые могут повлиять на чистоту, безопасность и/или эффективность продукта вследствие повышенных уровней

окисления. В некоторых случаях стабильность может относиться к изменениям показателей CQA продукта выше или ниже установленного порогового значения, которые могут влиять на чистоту, безопасность и/или эффективность продукта.

Связывающие свойства антигенсвязывающих молекул

[0059] При использовании в настоящем документе термин "связывание" в отношении связывания антигенсвязывающей молекулы, антитела, иммуноглобулина, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка, например, с определенным антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент, как правило, относится к взаимодействию или ассоциации между как минимум двумя единицами или молекулярными структурами, такому как взаимодействие антитела-антигена.

[0060] Например, аффинность связывания обычно соответствует значению K_D приблизительно 10^{-7} М или меньше, например, приблизительно 10^{-8} М или меньше, например, приблизительно 10^{-9} М или меньше, при определении, например, методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе BIAcore 3000 при использовании антигена в качестве лиганда и антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка в качестве анализата (или антилиганда). Стратегии связывания на основе клеток, такие как сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS), также стандартно используются, причем данные FACS хорошо коррелируют с другими методами, такими как конкурентное связывание радиолиганда и SPR (Benedict, CA, J Immunol Methods. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. J Immunol Methods. 2005, 302(1-2):68-77).

[0061] Таким образом, антитело или антигенсвязывающий белок согласно изобретению связывается с определенным антигеном или молекулой клеточной поверхности (рецептором), обладая при этом аффинностью, соответствующей значению K_D , которое по меньшей мере в десять раз ниже, чем его аффинность при связывании с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). Согласно настоящему изобретению аффинность антитела, соответствующая значению K_D , которое равно или меньше чем в десять раз ниже, чем для неспецифического антигена, может считаться необнаружимым связыванием, однако такое антитело может быть спарено со вторым антигенсвязывающим плечом для получения биспецифического антитела согласно изобретению.

[0062] Термин " K_D " (М) относится к равновесной константе диссоциации для конкретного взаимодействия антитела-антигена или равновесной константе диссоциации для связывания антитела или связывающего фрагмента антитела с антигеном. Существует обратная зависимость между K_D и аффинностью связывания, при этом чем меньше значение K_D , тем выше, то есть сильнее, аффинность. Таким образом, термины "более высокая аффинность" или "более сильная аффинность" относятся к более высокой способности к взаимодействию и, следовательно, к меньшему значению K_D , и наоборот, термины "более низкая аффинность" или "более слабая аффинность" относятся к более низкой способности к взаимодействию и, следовательно, большему значению K_D . В

некоторых случаях более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, антитела) с ее интерактивной молекулой-партнером (например, антигеном X) в сравнении с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой интерактивной молекулой-партнером (например, антигеном Y) может быть выражена как коэффициент связывания, определяемый при делении большего значения K_D (более низкой или более слабой аффинности) на меньшее значение K_D (более высокую или более сильную аффинность), например, выражаемый в 5 раз или 10 раз более высокой аффинности связывание, в зависимости от обстоятельств.

[0063] Термин " k_d " (сек^{-1} или $1/\text{с}$) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитела-антигена или константе скорости диссоциации антитела или связывающего фрагмента антитела. Указанное значение также называется значением k_{off} .

[0064] Термин " k_a " ($M^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ или $1/M$) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитела-антигена или константе скорости ассоциации антитела или связывающего фрагмента антитела.

[0065] Термин " K_A " (M^{-1} или $1/M$) относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитела-антигена или равновесной константе ассоциации антитела или связывающего фрагмента антитела. Равновесную константу ассоциации получают при делении k_a на k_d .

[0066] Термин " EC_{50} " или " EC_{50} " относится к полумаксимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, которая индуцирует ответ на половине отрезка между базовой линией и максимумом после определенного времени воздействия. EC_{50} по существу представляет собой концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления значение EC_{50} равно концентрации антитела согласно изобретению, которая дает полумаксимальное связывание с клетками, экспрессирующими CD3 или опухолеассоциированный антиген, как определено, например, в анализе связывания FACS. Таким образом, сниженное или более слабое связывание наблюдается при повышении значения EC_{50} или полумаксимальной эффективной концентрации.

[0067] В одном варианте осуществления уменьшенное связывание может быть определено как повышенная концентрация EC_{50} антитела, которая обеспечивает связывание с полумаксимальным количеством клеток-мишеней.

[0068] В другом варианте осуществления значение EC_{50} представляет собой концентрацию антитела согласно изобретению, которая вызывает полумаксимальное истощение клеток-мишеней посредством Т-клеточной цитотоксической активности. Таким образом, увеличенная цитотоксическая активность (например, Т-клеточно-опосредованный лизис опухолевой клетки) наблюдается при пониженном значении EC_{50} или полумаксимальной эффективной концентрации.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы

[0069] Антигенсвязывающие молекулы, например антитела, согласно настоящему

изобретению могут быть моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными по отношению к разным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные больше чем к одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела согласно настоящему изобретению могут быть соединены или могут совместно экспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально соединены (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или более другими молекулярными единицами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифичного или мультиспецифичного антитела, обладающего второй или дополнительной специфичностью связывания.

[0070] При использовании в настоящем документе выражение "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, включающий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарности области (CDR), которая отдельно или в комбинации с одной или более дополнительными CDR-областями и/или каркасными областями (FR) специфично связывается с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела в соответствии с определением этих терминов в другой части настоящего документа.

[0071] При использовании в настоящем документе выражение "биспецифичная антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, включающий, по меньшей мере, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифичной антигенсвязывающей молекуле включает по меньшей мере одну CDR, которая отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными CDR и/или FR специфично связывается с конкретным антигеном.

[0072] В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифичное антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифичного антитела включает переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифичное антитело), CDR-области первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом "A1", и CDR-области второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом "A2". Таким образом, CDR-области первого антигенсвязывающего домена могут быть указаны в настоящем документе как A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; а CDR-области второго антигенсвязывающего домена могут быть указаны в настоящем документе как A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

[0073] Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть непосредственно или опосредованно связаны друг с другом, с формированием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы настоящего изобретения. В альтернативе первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть связаны с отдельным мультимеризирующим доменом. Ассоциация одного мультимеризирующего домена с другим мультимеризирующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, с образованием в результате биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. При использовании в настоящем документе "мультимеризирующий домен" представляет собой любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которые обладают способностью связываться со вторым мультимеризирующим доменом такой же или подобной структуры или строения. Например, мультимеризирующий домен может быть полипептидом, содержащим C_H3 домен иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризирующего компонента является Fc-фрагмент иммуноглобулина (содержащий C_H2-C_H3 домен), например, Fc-домен IgG, выбранный из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в пределах каждой группы изоформ.

[0074] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат два мультимеризирующих домена, например, два Fc-домена, каждый из которых индивидуально является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризирующие домены могут относиться к одному изоформе IgG, такому как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. В альтернативе первый и второй мультимеризирующие домены могут относиться к разным изоформам IgG, таким как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

[0075] В некоторых вариантах осуществления мультимеризирующий домен является Fc-фрагментом или аминокислотной последовательностью длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащей по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления мультимеризирующий домен является остатком цистеина или коротким цистеинсодержащим пептидом. Другие мультимеризирующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или суперспирального мотива.

[0076] Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению может применяться любой формат или технология получения биспецифичных антител. Например, антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с первым антигеном, могут быть функционально соединены (например, посредством химического сшивания, генетического слияния, нековалентного связывания или иным способом) с одним или более другими молекулярными единицами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, обладающие специфичностью связывания со вторым антигеном, с получением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Конкретные примеры биспецифичных форматов, которые могут использоваться в рамках настоящего изобретения, включают, без ограничения, например,

биспецифичные форматы на основе scFv или диател, слитые конструкции IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступ-во-впадину, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступом-во-впадину и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойной активности (DAF)-IgG и биспецифичные форматы Mab² (см., например, обзор вышеуказанных форматов в публикации Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и в источниках, цитируемых в ней).

[0077] В отношении биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, мультимеризирующие домены, например Fc-домены, могут включать изменения одной или более аминокислот (например, вставки, делеции или замены) по сравнению с природной версией Fc-домена дикого типа. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, включающие одну или более модификаций в Fc-домене, которые приводят к получению модифицированного Fc-домена, который отличается модифицированным взаимодействием связывания (например, усиленным или ослабленным) между Fc и FcRn. В одном варианте осуществления настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в C_H2 или C_H3 области, при этом такая модификация увеличивает аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, в которой pH изменяется в пределах от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0078] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый C_H3 домен и второй C_H3 домен Ig, где первый и второй C_H3 домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и где отличие по меньшей мере на одну аминокислоту снижает связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, в котором отсутствует аминокислотное различие. В одном варианте осуществления первый C_H3 домен Ig связывается с белком А, а второй C_H3 домен Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание с белком А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно включать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). См., например, патент США 8,586,713. Дополнительные модификации, которые могут

присутствовать во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4.

[0079] В некоторых вариантах осуществления Fc-домен может быть химерным, объединяя в себе последовательности Fc, полученные из иммуноглобулинов более чем одного изотипа. Например, химерный Fc-домен может включать часть или всю последовательность C_H2, полученную из C_H2 области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и часть или всю последовательность C_H3, полученную из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный Fc-домен также может содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать последовательность "верхнего шарнира", полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, объединенную с последовательностью "нижнего шарнира", полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, включает, от N- к C-концу: [C_H1 IgG4]-[верхний шарнир IgG4]-[нижний шарнир IgG2]-[C_H2 IgG4]-[C_H3 IgG4]. Другой пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, содержит, от N- к C-концу: [C_H1 IgG1]-[верхний шарнир IgG1]-[нижний шарнир IgG2]-[IgG4 C_H2]-[C_H3 IgG1]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, описаны в публикации US 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 года, которая включена в настоящую заявку во всей своей полноте. Химерные Fc-домены, имеющие такие общие структурные конфигурации, и варианты указанных доменов могут обладать измененным связыванием с Fc-рецептором, что в свою очередь оказывает влияние на эффекторную функцию Fc.

рН-зависимое связывание

[0080] Настоящее изобретение включает антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело согласно настоящему изобретению может демонстрировать сниженное связывание с антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. В альтернативе антитела согласно изобретению могут демонстрировать увеличенное связывание с антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение "кислый рН" включает значения рН меньше чем приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или меньше. При использовании в настоящем документе выражение "нейтральный рН" означает рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение "нейтральный рН" включает значения рН приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3,

7,35 и 7,4.

[0081] В некоторых случаях "сниженное связывание... при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" выражено в виде отношения значения K_D связывания антитела с его антигеном при кислом рН к значению K_D связывания антитела с его антигеном при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующие "сниженное связывание с MUC16 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" в рамках настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует отношение K_D в кислой/нейтральной среде приблизительно 3,0 или больше. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления отношение K_D в кислой/нейтральной среде для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или больше.

[0082] Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на пониженное (или повышенное) связывание с конкретным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Кроме того, антитела с рН-зависимыми характеристиками можно получить путем модификаций антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот. Например, путем замены одной или более аминокислот в антигенсвязывающем домене (например, в пределах CDR) остатком гистидина может быть получено антитело со сниженным связыванием антигена при кислом рН по сравнению с нейтральным рН.

Антитела, включающие варианты Fc

[0083] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы включают Fc-домен, включающий одну или более мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Например, настоящее изобретение включает антитела, включающие мутацию в C_H2 или C_H3 области Fc-домена, где мутация(и) увеличивает аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, в которой рН изменяется в пределах от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению полупериода существования антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например,

V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T, и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0084] Например, настоящее изобретение включает антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, включающие Fc-домен, включающий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации предыдущих мутаций Fc-домена и другие мутаций в переменных доменах антител, раскрытых в настоящем документе, предусмотрены в рамках настоящего изобретения.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифичных молекул

[0085] Антигенсвязывающие домены, специфичные в отношении конкретных антигенов, могут быть получены с помощью любой технологии создания антител, известной в уровне техники. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфичных в отношении двух разных антигенов, можно соответствующим образом расположить относительно друг друга с получением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению с применением стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления один или более индивидуальных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно изобретению получены из химерных, гуманизированных антител или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в уровне техники. Например, одна или более из тяжелых и/или легких цепей биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению могут быть получены с применением технологии VELOCIMMUNE™. При использовании технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения антител человека) сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела против конкретного антигена, содержащие переменную область человека и константную область мыши. Антитела исследуют и отбирают на присутствие требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяют нужной константной областью человека с получением полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые можно включить в биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению.

[0086] Для получения человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул могут использовать генетически модифицированных животных. Например, могут использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна к перестройке и экспрессии эндогенной последовательности переменной области легкой цепи мышинового иммуноглобулина, где мышь экспрессирует только один или два переменных домена легкой цепи человека, кодируемые человеческими иммуноглобулиновыми последовательностями, функционально связанными с геном константной области каппа

мышь в эндогенном локусе каппа мыши. Такие генетически модифицированные мыши могут использоваться для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, включающих две разные тяжелые цепи, которые ассоциированы с идентичной легкой цепью, которая содержит вариабельный домен, полученный из одного из двух разных сегментов гена вариабельной области легкой цепи человека (см., например, US 2011/0195454). Полностью человеческий относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или домену иммуноглобулина, включающему аминокислотную последовательность, кодируемую ДНК, полученной из человеческой полноразмерной последовательности каждого полипептида антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или домена иммуноглобулина. В некоторых случаях полностью человеческая последовательность получена из белка, эндогенного для человека. В других случаях полностью человеческий белок или белковая последовательность включают химерную последовательность, в которой каждая составляющая ее последовательность получена из человеческой последовательности. Без ограничения какой-либо теорией, химерные белки или химерные последовательности обычно создают так, чтобы свести к минимуму образование иммуногенных эпитопов в соединениях составляющих их последовательностей, например, по сравнению с любыми областями или доменами человеческих иммуноглобулинов дикого типа.

Способы снижения окисляющих газов в свободном объеме контейнеров фармацевтического продукта

[0087] Способы согласно настоящему изобретению предоставляют фармацевтические продукты с повышенной стабильностью и увеличенным сроком хранения за счет минимизации вариантов с другим зарядом и/или агрегатов, образующихся в результате окислительного разложения. Способы согласно настоящему изобретению включают откачку газа из свободного объема контейнеров фармацевтического продукта и последующую продувку свободного объема неокисляющим газом (например, азотом или аргоном) для снижения концентрации кислорода и/или других окисляющих газов, таких как озон, пероксиды, хлор, фтор, монооксид азота, диоксид азота, закись азота или их комбинации. Способы могут выполнять в вакуумной камере (например, в камере лиофильной сушки). В одном варианте осуществления вакуумная камера снабжена вакуумметром Пирани (датчиком теплопроводности) для точного измерения и, таким образом, контроля давления в пределах диапазонов, указанных в настоящем документе. В различных вариантах осуществления способы осуществляют в асептических условиях и/или в условиях, которые удовлетворяют стандартам надлежащей производственной практики (GMP) для производства лекарственных средств.

[0088] Способы согласно настоящему изобретению могут применяться для производства фармацевтических продуктов в герметичном контейнере, содержащем рекомбинантный белок или антигенсвязывающий белок (например, антитело или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу) в жидкой композиции. Лекарственные

продукты изготавливают так, чтобы они содержали сниженную концентрацию кислорода и/или других окисляющих газов в свободном объеме контейнера фармацевтического продукта. Способы производства фармацевтического продукта в герметичном контейнере в соответствии с настоящим изобретением включают: (a) загрузку одного или более контейнеров, содержащих жидкую композицию рекомбинантного белка или антигенсвязывающего белка (например, антитела), в вакуумную камеру при атмосферном давлении, (b) вакуумирование камеры при первом давлении от приблизительно 0,05 бар до приблизительно 0,15 бар, (c) продувку камеры неокисляющим газом при втором давлении от приблизительно 800 мбар до приблизительно 1000 мбар и (d) герметизацию одного или более контейнеров внутри герметичной вакуумной камеры. В некоторых вариантах осуществления стадии процесса (b) и (c) повторяют один или более раз перед герметизацией контейнера(ов) для дополнительного снижения концентрации окисляющих газов в свободном объеме. В различных вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению могут применяться для производства фармацевтических продуктов с содержанием кислорода (или других окисляющих газов) меньше 5% в свободном объеме контейнера. В некоторых случаях концентрация окисляющего газа снижена до меньше чем 4%, меньше чем 3%, меньше чем 2% или меньше чем 1%. В некоторых вариантах осуществления концентрация окисляющего газа (например, кислорода) составляет не больше чем 0,5%, не больше чем 0,4%, не больше чем 0,3%, не больше чем 0,2% или не больше чем 0,1%.

[0089] В некоторых вариантах осуществления конечная требуемая концентрация кислорода (или другого окисляющего газа) может быть задана, при этом количество циклов процесса вакуумирования/продувки, обсуждаемого выше, могут соответствующим образом регулироваться для достижения требуемой конечной концентрации. Например, в одном варианте осуществления способ контроля содержания кислорода в свободном объеме герметичного контейнера фармацевтического продукта включает: (a) определение требуемого конечного содержания кислорода в свободном объеме герметичного контейнера; (b) вычисление конечного % содержания кислорода после первого цикла снижения содержания кислорода согласно уравнению (I):

$$\%O_{2, \text{конец}} = \left(\frac{P_{\text{вакуума}}}{P_{\text{продувки}}} \right) * \%O_{2, \text{начало}}$$

(I)

где $\%O_{2, \text{начало}}$ является % содержанием кислорода в начале первого цикла, $P_{\text{вакуум}}$ является давлением вакуумирования, применяемым в первом цикле снижения содержания кислорода, $P_{\text{продувки}}$ является давлением выше $P_{\text{вакуум}}$, но меньше 1 бара и $\%O_{2, \text{конец}}$ является % содержанием кислорода в конце первого цикла; (c) необязательно применение уравнения (I) к дополнительным циклам, где $\%O_{2, \text{начало}}$ является % содержанием кислорода в конце предыдущего цикла, пока не будет достигнуто требуемое конечное содержание кислорода; и (d) изготовление фармацевтического продукта в герметичном контейнере при: (i) выполнении одного или более циклов снижения содержания

кислорода путем вакуумирования негерметизированного контейнера в вакуумной камере при $P_{\text{вакуум}}$, где $P_{\text{вакуум}}$ является давлением от 0,05 бар до 0,15 бар, и продувки негерметизированного контейнера в вакуумной камере неокисляющим газом при давлении продувки от 800 мбар до 1000 мбар; и (ii) герметизацию контейнера.

[0090] В различных вариантах осуществления давление поддерживают на уровне выше давления паров воды, чтобы избежать испарения жидкой композиции, содержащей рекомбинантные белки или антигенсвязывающие белки. В различных вариантах осуществления вакуумирование и/или продувка вакуумной камеры происходит при давлении от приблизительно 0,02 бар до приблизительно 0,2 бар. В одном варианте осуществления вакуумирование происходит при давлении приблизительно 0,1 бар, а продувка происходит при давлении от приблизительно 800 мбар до приблизительно 1000 мбар. Неокисляющий газ, используемый при продувке барокамеры, может быть выбран, например, из азота, аргона, гелия, ксенона, неона, криптона и радона. В одном варианте осуществления неокисляющим газом является азот. В другом варианте осуществления неокисляющим газом является аргон. В различных вариантах осуществления способы проводят при температуре в диапазоне от приблизительно 5-45°C или в диапазоне от приблизительно 10-37°C. В различных вариантах осуществления способы проводят при температуре в диапазоне от приблизительно 15-25°C. В некоторых случаях температура составляет приблизительно 15°C, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C или приблизительно 25°C. В одном варианте осуществления температуру всех циклов поддерживают приблизительно при 19°C.

[0091] Композиции рекомбинантных белков или антигенсвязывающих белков, герметизированные в контейнерах фармацевтического продукта в соответствии со способами настоящего изобретения, могут быть любой из различных композиций, обсуждаемых выше или в настоящем документе. Например, жидкие композиции антигенсвязывающих белков (например, антитела) могут быть изготовлены с различными вспомогательными веществами, включающими буферы, регуляторы тоничности, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества и т.п., при этом белки могут присутствовать в концентрациях от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела или другого антигенсвязывающего белка составляет от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл, от 1 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл или от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл. В некоторых случаях концентрация составляет меньше 10 мг/мл, меньше 5 мг/мл, меньше 2 мг/мл или меньше 1 мг/мл.

[0092] Как обсуждается выше, после снижения содержания окисляющего газа в свободном объеме контейнера(ов), контейнер(ы) полностью закрывают/укупоривают и окончательно герметизируют. Пробка может быть изготовлена из различных материалов (например, полимера, резины) и может демонстрировать эластомерные свойства

(например, достаточную жесткость, эластичность), которые требуются для сцепления с контейнером. В некоторых вариантах осуществления пробка изготовлена из синтетического каучука. В некоторых вариантах осуществления пробка изготовлена из бутилкаучука. Пробка может включать одно или более отверстий или ножек для лиофильной сушки. Пробка может быть предназначена для формирования и сохранения эластомерного герметичного соединения и, в некоторых вариантах осуществления, может быть пробкой, предназначенной для стандартных процедур лиофильной сушки. Таким образом, пробка для применения во флаконе в камере лиофильной сушки может быть частично укупорена, при этом отверстие(я) для лиофильной сушки оставляют открытыми во внешнее воздушное пространство во время процесса введения слоя газа/снижения содержания кислорода, а затем полностью укупоривают и герметизируют в соединении с контейнером после одного или более циклов снижения содержания кислорода. Примеры конфигураций систем лиофильной сушки, прижимного колпачка и пробки представлены в руководстве FDA "Lyophilization of Parenteral (7/93)" и публикации Bhambhani and Medi, "Selection of Containers/Closures for Use in Lyophilization Applications: Possibilities and Limitations", American Pharmaceutical Review, May 1, 2010, содержание которых настоящим включено посредством отсылки во всей их полноте.

ПРИМЕРЫ

[0093] Следующие примеры приведены для предоставления специалистам в данной области полного раскрытия и описания способов осуществления и применения изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых числовых значений (например, количеств, температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по весу, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или приближено к атмосферному давлению.

Пример 1: Снижение содержания кислорода в свободном объеме фармацевтического продукта

[0094] В данном примере в качестве вакуумной камеры использовали камеру лиофильной сушки стандарта GMP, оснащенную вакуумметром Пирани для измерения и игольчатым клапаном для контроля давления. Биспецифичное антитело в концентрации 2 мг/мл в жидкой композиции фасовали во флакон, снабженный резиновой пробкой с ножками для лиофильной сушки, и вводили слой азота в процессе из двух циклов для снижения содержания кислорода в свободном объеме с ~21% до приблизительно 0,25%.

[0095] Таблица 1: Процесс формирования слоя неокисляющего газа

Этап	Фаза	Удерживание /изменение температуры полка (°C)	Скорость изменения температур	Давление в камере	Длительность этапа (ч:мин)
1	Начало	N/A	N/A	N/A	N/A

2	Открытие/ закрывание замка дверцы	N/A	N/A	N/A	N/A
3	Продувка	N/A	N/A	до +0,02	N/A
4	Загрузка	+19	N/A	Атмосферное	00:01
5	Стабилизация	+19	N/A	Атмосферное	00:05
6	Запуск вакуумирования	+19	N/A	100 мбар (Пирани, контроль вакуумными клапанами)	00:01
7	Продувка (N ₂)	+19	N/A	912 мбар	N/A
8	Конец	N/A	N/A	N/A	N/A

[0096] После помещения флаконов в камеру, подключали вакуум (этап 6) для удаления газа (который в начале процесса является воздухом, содержащим ~21% кислорода) из камеры. Давление (100000 мкбар) превышает давление паров воды, чтобы избежать испарения, образования пены и возможных брызг, и измеряется с помощью датчика Пирани. В обычных условиях лиофилизации присутствует вакуум при гораздо более низком давлении (порядка 150 мкбар), поэтому давление контролируют с помощью емкостного манометра. Однако емкостный манометр точен только при давлениях ниже приблизительно 2000 мкбар и не может использоваться для контроля давления при 100000 мкбар.

[0097] После достижения давления 100000 мкбар камеру наполняли азотом, заменяющим откачиваемый воздух.

[0098] Процесс повторяли второй раз, чтобы еще больше снизить уровни кислорода (2-й Цикл, Этапы 3-4, ниже). Как только был достигнут требуемый уровень кислорода, флаконы укупоривали (2-й Цикл, Этап 5, ниже).

[0099] **Таблица 2: Процесс формирования слоя неокисляющего газа, продолжение**

Этап	Фаза	Удерживание /изменение температуры полок (°C)	Скорость изменения температур	Давление в камере	Длительность этапа (ч:мин)
1	Начало	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Стабилизация	+19	N/A	Атмосферное	00:05
3	Стабилизация	+19	N/A	100 мбар (Пирани, контроль вакуумных клапанов)	00:01
4	Предварительная продувка (N ₂)	+19	N/A	912 мбар	00:01
5	Укупорка	+19	N/A	912 мбар	(130 бар в течение 30 сек)
6	Выгрузка	+19	N/A	Атмосферное	N/A
7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

[0100] Уравнение содержания кислорода:

$$\%O_{2, \text{конец}} = \left(\frac{P_{\text{вакуума}}}{P_{\text{продувки}}} \right) * \%O_{2, \text{начало}}$$

P=Давление

[0101] Пример вычисления, из процесса, обсуждаемого выше в Примере 1:

Цикл 1

$P_{\text{вакуума}}=100$ мбар

$P_{\text{продувки}}=912$ мбар

$\%O_{2, \text{начало}}=21\%$ (процесс начинают с воздухом в камере)

$$\%O_{2, \text{конец}} = \left(\frac{100 \text{ мбар}}{912 \text{ мбар}} \right) * 21\%$$

$$\%O_{2, \text{конец}} = 2,3\%$$

Цикл 2

$P_{\text{вакуума}}=100$ мбар

$P_{\text{продувки}}=900$ мбар

$\%O_{2, \text{начало}}=2\%$

$$\%O_{2, \text{конец}} = \left(\frac{100 \text{ мбар}}{912 \text{ мбар}} \right) * 2,3\%$$

$$\%O_{2, \text{конец}} = 0,25\%$$

Пример 2: Исследование стабильности фармацевтических продуктов

[0102] Анализы стабильности выполняли для различных фармацевтических продуктов, изготовленных с применением процесса, обсуждаемого в Примере 1, с различными концентрациями кислорода в свободном объеме, и сравнивали с контролями, в которых кислород в свободном объеме присутствовал на атмосферном или приближенном к атмосферному уровню (~21%). В некоторых случаях (отмеченных в настоящем документе) азот заменяли аргоном в этапах продувки процесса. Примеси с высокой молекулярной массой (НМВ) обнаруживали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭВЭЖХ), а варианты с другими зарядами обнаруживали с помощью катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (КОХ-ВЭЖХ).

[0103] Как показано на Фигуре 1, снижение содержания кислорода в свободном объеме с 21% до меньше чем 1% путем создания слоя азота уменьшает разложение биспецифичного антитела, наблюдаемое с помощью КОХ-ВЭЖХ, после 31 месяца хранения при 5°C. При содержании кислорода 21%, процентное изменение основных вариантов с разными зарядами составляло приблизительно 46,25%, тогда как при содержании кислорода <1% процентное изменение снижалось до приблизительно 8,75% в течение всего периода хранения.

[0104] Как показано на Фигуре 2, снижение содержания кислорода в свободном объеме с 21% до 0,1% путем создания слоя азота повышало стабильность второго биспецифичного антитела, на что указывало снижение процентного увеличения содержания примесей НМВ через 28 дней хранения при 45°C. При содержании кислорода 21% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось

приблизительно на 8,62%. При содержании кислорода 15% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 8,53%. При содержании кислорода 10% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 4,74%. При содержании кислорода 5% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 1,42%, а при содержании кислорода 0,1% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 0,24%.

[0105] На Фигуре 3 показано снижение процентного увеличения содержания примесей НМВ для второго биспецифичного антитела, наблюдаемое после трех месяцев хранения при 45°C, после процесса создания слоя азота для снижения содержания кислорода в свободном объеме. При содержании кислорода 5% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 9,66%. При содержании кислорода 2% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 7,27%. При содержании кислорода 1% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 4,54%, а при содержании кислорода меньше 1% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 0,34%.

[0106] На Фигуре 4 показано такое же содержание кислорода в свободном объеме для второго биспецифичного антитела, хранившегося при 45°C в течение трех месяцев, как на Фигуре 3, за исключением того, что азот в процессе введения слоя заменяли аргоном. При содержании кислорода 5% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 16,72%. При содержании кислорода 2% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 13,05%. При содержании кислорода 1% в течение периода хранения процентное содержание примесей НМВ увеличилось приблизительно на 7,68%, однако при содержании кислорода меньше 1%, поддающегося обнаружению увеличения примесей НМВ в течение указанного периода хранения не наблюдали.

[0107] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Фактически, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе, будут очевидными для специалистов в данной области техники из предыдущего описания. Предусмотрено, что такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильный жидкий фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок в жидкой композиции, и свободный объем, включающий газ, где газ содержит меньше 5% кислорода по объему, при этом рекомбинантный белок является стабильным в течение по меньшей мере 28 дней в случае хранения при 45°C, где стабильный в течение по меньшей мере 28 дней относится к увеличению процентного содержания примесей с высокой молекулярной массой не больше чем на 2% в течение указанного периода.
2. Фармацевтический продукт по п.1, где газ содержит не больше 2% кислорода по объему.
3. Фармацевтический продукт по п.2, где газ содержит не больше 1% кислорода по объему.
4. Фармацевтический продукт по п.3, где газ содержит меньше 1% кислорода по объему.
5. Фармацевтический продукт по п.4, где газ содержит не больше 0,1% кислорода по объему.
6. Фармацевтический продукт по любому из пп.1-5, где жидкая композиция содержит рекомбинантный белок в концентрации меньше 10 мг/мл.
7. Фармацевтический продукт по п.6, где концентрация рекомбинантного белка составляет меньше 5 мг/мл.
8. Фармацевтический продукт по п.7, где концентрация рекомбинантного белка составляет меньше 2 мг/мл.
9. Фармацевтический продукт по любому из пп.1-5, где жидкая композиция содержит рекомбинантный белок в концентрации от 1 мг/мл до 200 мг/мл.
10. Фармацевтический продукт по любому из пп.1-9, где рекомбинантный белок является стабильным в течение по меньшей мере трех месяцев в случае хранения при 45°C, где стабильный в течение по меньшей мере трех месяцев относится к увеличению процентного содержания примесей с высокой молекулярной массой не больше чем на 10% в течение указанного периода.
11. Фармацевтический продукт по п.10, где стабильный в течение по меньшей мере трех месяцев относится к увеличению процентного содержания примесей с высокой молекулярной массой не больше чем на 5% в течение указанного периода.
12. Фармацевтический продукт по п.11, где стабильный в течение по меньшей мере трех месяцев относится к увеличению процентного содержания примесей с высокой молекулярной массой меньше чем на 1% в течение указанного периода.
13. Стабильный жидкий фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок в жидкой композиции, и свободный объем, включающий газ, где газ содержит меньше 5% кислорода по объему, при этом рекомбинантный белок является стабильным в течение по меньшей мере 28 дней в случае хранения при 45°C, где стабильный относится к изменению по меньшей мере одного

продукта CQA выше или ниже заданного порогового значения.

14. Фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок в жидкой композиции, и свободный объем, включающий газ, где газ содержит меньше 1% кислорода по объему, и антигенсвязывающий белок является стабильным в течение по меньшей мере 31 месяца в случае хранения при 5°C, где стабильный в течение по меньшей мере 31 месяца относится к изменению процентного содержания вариантов с другим зарядом не больше чем на 10% в течение указанного периода.

15. Фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок в жидкой композиции, и свободный объем, включающий газ, где газ содержит меньше 1% кислорода по объему.

16. Фармацевтический продукт по п.15, где газ содержит не больше 0,1% кислорода по объему.

17. Фармацевтический продукт по любому из п.1-16, где рекомбинантный белок является антигенсвязывающим белком.

18. Фармацевтический продукт по п.17, где антигенсвязывающий белок является моноспецифичным антителом.

19. Фармацевтический продукт по п.17, где антигенсвязывающий белок является биспецифичным антителом.

20. Фармацевтический продукт по любому из пп.1-19, где контейнер является флаконом.

21. Фармацевтический продукт по п.20, где флакон включает пробку, имеющую одну или более ножек для лиофильной сушки.

22. Способ получения фармацевтического продукта в герметичном контейнере, содержащем рекомбинантный белок в жидкой композиции, и свободный объем, включающий газ с пониженным содержанием кислорода, где способ включает:

(a) загрузку одного или более контейнеров, содержащих жидкую композицию рекомбинантного белка, в вакуумную камеру под атмосферным давлением;

(b) вакуумирование камеры при первом давлении от 0,05 бар до 0,15 бар;

(c) продувку камеры неокисляющим газом при втором давлении, которое больше, чем первое давление, но меньше 1 бара; и

(d) герметизацию одного или более контейнеров,

где способ проводят при температуре в диапазоне от 5-45°C, и герметичный контейнер включает газ в свободном объеме с содержанием кислорода меньше 5% по объему.

23. Способ по п.22, дополнительно включающий повтор этапов (b) и (c) один или более дополнительных раз до герметизации одного или более контейнеров.

24. Способ по п.22 или 23, где первое давление составляет приблизительно 0,1 бар.

25. Способ по любому из пп.22-24, где второе давление составляет от приблизительно 800 мбар до приблизительно 1000 мбар.

26. Способ по любому из пп.22-25, где температура находится в диапазоне от приблизительно 15-25°C.
27. Способ по п.26, где температура составляет приблизительно 19°C.
28. Способ по любому из пп.22-27, где герметичный контейнер включает газ в свободном объеме с содержанием кислорода меньше 2% по объему.
29. Способ по п.28, где герметичный контейнер включает газ в свободном объеме с содержанием кислорода меньше 1% по объему.
30. Способ по п.29, где герметичный контейнер включает газ в свободном объеме с содержанием кислорода не больше 0,1% по объему.
31. Способ по любому из пп.22-30, где жидкая композиция содержит рекомбинантный белок в концентрации от 1 мг/мл до 200 мг/мл.
32. Способ по любому из пп.22-30, где жидкая композиция содержит рекомбинантный белок в концентрации меньше 10 мг/мл.
33. Способ по п.32, где концентрация рекомбинантного белка составляет меньше 5 мг/мл.
34. Способ по п.33, где концентрация рекомбинантного белка составляет меньше 2 мг/мл.
35. Способ по любому из пп.22-34, где рекомбинантный белок является антигенсвязывающим белком.
36. Способ по п.35, где антигенсвязывающий белок является моноспецифичным антителом.
37. Способ по п.35, где антигенсвязывающий белок является биспецифичным антителом.
38. Способ по любому из пп.22-37, где контейнер является флаконом.
39. Способ по п.38, где флакон включает пробку, имеющую одну или более ножек для лиофильной сушки.
40. Способ по п.39, где одна или более ножек для лиофильной сушки частично закрыты во время этапа (b) и/или этапа (c).
41. Способ по п.39 или 40, где одна или более ножек для лиофильной сушки полностью закрыты во время этапа (d).
42. Способ по п.22, где давление в камере измеряют с помощью вакуумметра Пирани.
43. Способ по любому из пп.22-42, где неокисляющий газ является азотом.
44. Способ по любому из пп.22-42, где неокисляющий газ является аргоном.
45. Способ по любому из пп.22-42, где неокисляющий газ выбран из группы, состоящей из гелия, ксенона, неона, криптона и радона.
46. Способ контроля содержания кислорода в свободном объеме герметичного контейнера, содержащего жидкую фармацевтическую композицию, включающий:
 - (a) определение требуемого конечного содержания кислорода в свободном объеме герметичного контейнера;

(b) вычисление конечного % содержания кислорода после первого цикла снижения содержания кислорода согласно уравнению (I):

$$\%O_{2, \text{конец}} = \left(\frac{P_{\text{вакуума}}}{P_{\text{продувки}}} \right) * \%O_{2, \text{начало}}$$

(I)

где $\%O_{2, \text{начало}}$ является % содержанием кислорода в начале первого цикла, $P_{\text{вакуум}}$ является давлением вакуумирования, применяемым в первом цикле снижения содержания кислорода, $P_{\text{продувки}}$ является давлением выше $P_{\text{вакуум}}$, но меньше 1 бара, и $\%O_{2, \text{конец}}$ является % содержанием кислорода в конце первого цикла;

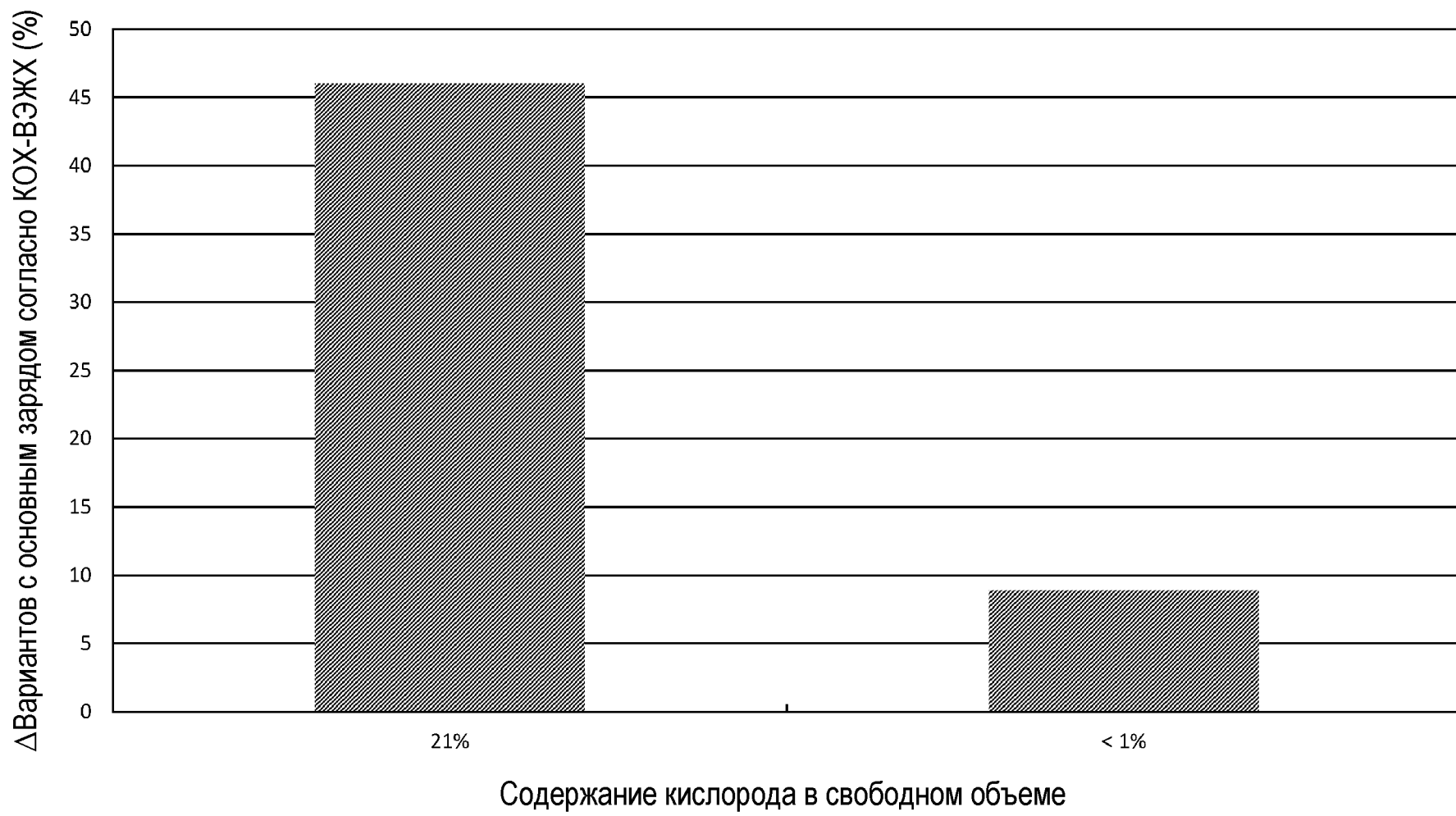
(c) необязательно применение уравнение (I) к дополнительным циклам, где $\%O_{2, \text{начало}}$ является % содержанием кислорода в конце предыдущего цикла, пока не будет достигнуто требуемое конечное содержание кислорода; и

(d) получение фармацевтического продукта в герметичном контейнере путем: (i) выполнения одного или более циклов снижения содержания кислорода, вакуумирования негерметизированного контейнера в вакуумной камере при $P_{\text{вакуум}}$, где $P_{\text{вакуум}}$ является давлением от 0,05 бар до 0,15 бар, и продувки негерметизированного контейнера в вакуумной камере неокисляющим газом при давлении продувки от 800 мбар до 1000 мбар; и (ii) герметизации контейнера.

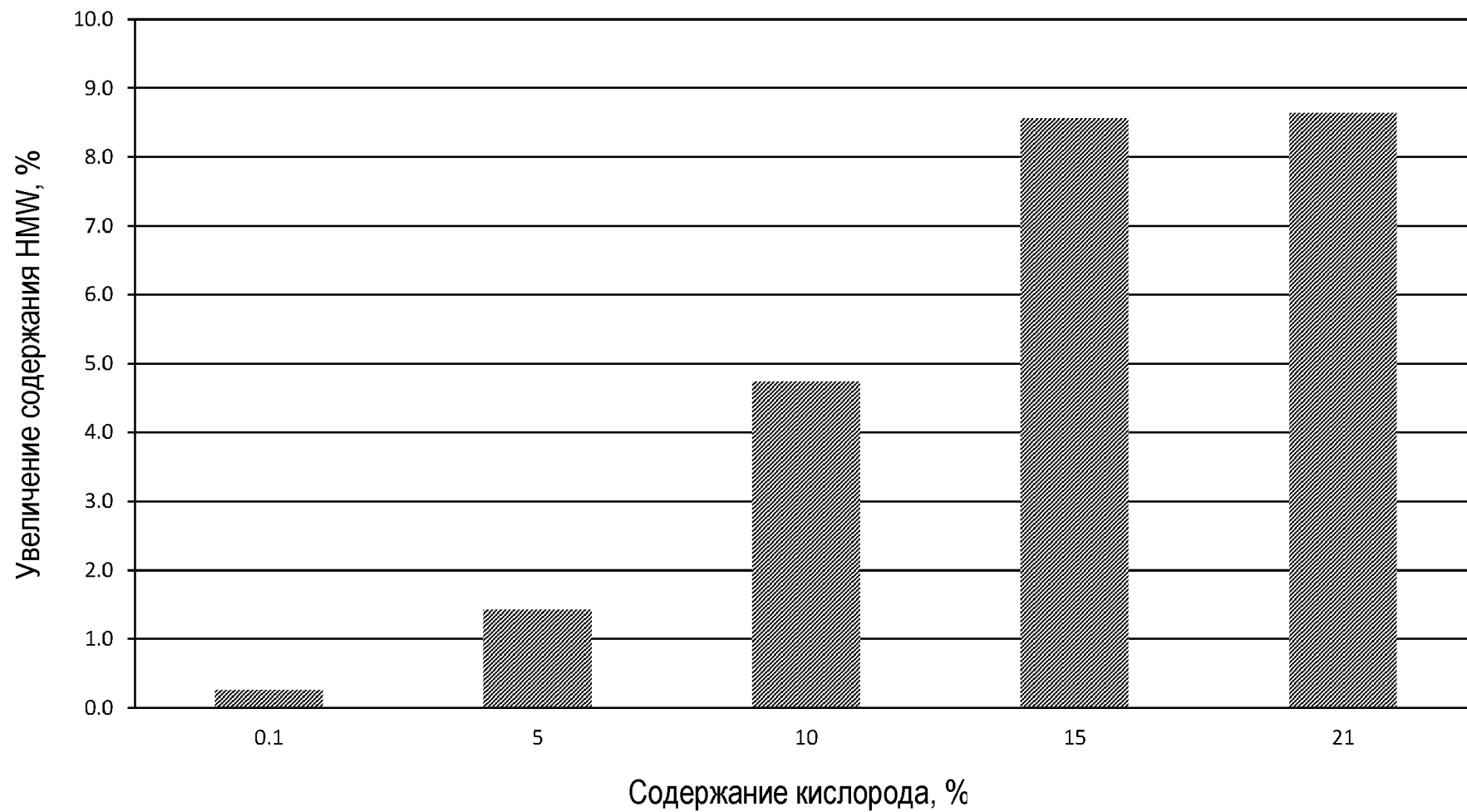
47. Фармацевтический продукт, включающий герметичный контейнер, содержащий рекомбинантный белок в жидкой композиции, и свободный объем, включающий газ, где газ содержит контролируемый и заданный уровень кислорода, и где контейнер включает пробку, имеющую одну или более ножек для лиофильной сушки.

По доверенности

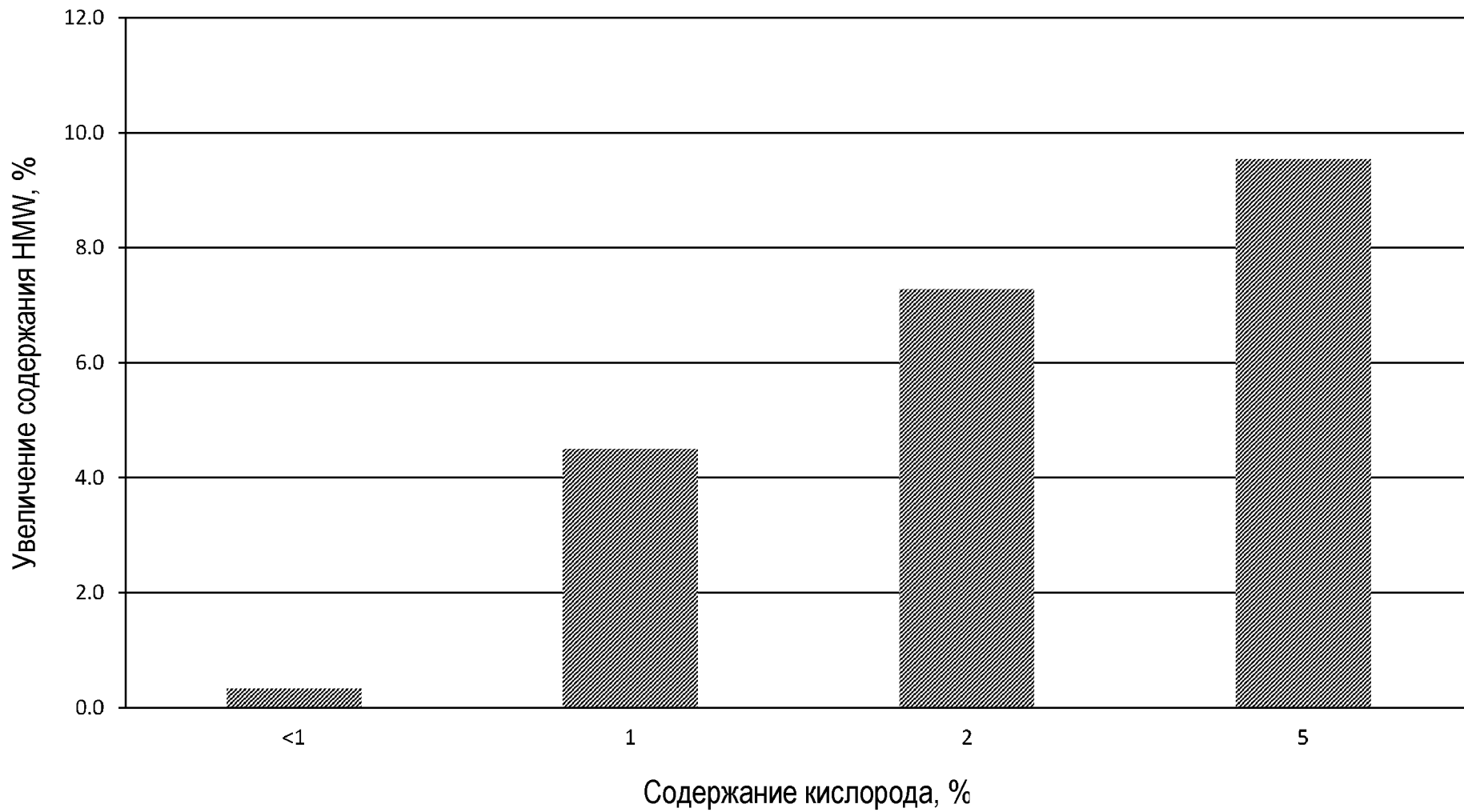
ФИГ.1



ФИГ.2



ФИГ.3



ФИГ.4

