

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091295** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.09.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.13

(54) **ПРЕПАРАТ**

(31) **1719447.3**

(32) **2017.11.23**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2018/081129**

(87) **WO 2019/101582 2019.05.31**

(71) Заявитель:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:

**Дюрран Сандрин, Йейтс Эндрю
Джеффри (GB)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело или его фрагмент, которое связывает IL-17A и IL-17F, и сочетание глицина, ацетатного буфера с pH 4,6-5,5 и полисорбата 80.

A1

202091295

202091295

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562554EA/019

ПРЕПАРАТ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических препаратов. Более конкретно, оно относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, глицин, ацетатный буфер и полисорбат 80.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Количество биологических препаратов, получивших одобрение со времени начала использования технологий рекомбинантных ДНК, возросло, и хотя область оставалась динамичной в отношении типов биологических препаратов, целевых заболеваний и механистической основы активности лекарственных препаратов, в последние годы количество одобренных к применению терапевтических препаратов на основе антител намного превосходит количество других одобренных биологических препаратов.

Для того, чтобы терапия антителами проводилась в удобной для пациента форме, чрезвычайно важны режим и время введения. Эти аспекты особенно важны в случае хронических заболеваний, когда пациенты полагаются на препарат, позволяющий им вести образ жизни, наиболее близкий к образу жизни здоровых людей. Лекарственные средства, требующие длительного времени введения, возможно, с госпитализацией, обычно не рассматриваются как удобные для пациента. Подкожное введение, выполняемое в комфортных условиях дома пациента, очень востребовано. Однако возникает целый ряд проблем, когда антитела должны быть сформулированы в высоких концентрациях в жидких препаратах, таких как те, которые пациент сам вводит себе подкожно.

Антитела, хотя и являются достаточно стабильными молекулами, при хранении в течение определенного периода времени могут становиться химически и физически нестабильными. Типичная химическая нестабильность может приводить к дезамидированию, гидролизу, окислению, бета-элиминированию, дисульфидному обмену или восстановлению. Физическая нестабильность может приводить к денатурации, агрегации или осаждению. Как химическая, так и физическая, нестабильность гораздо более выражена, когда антитела хранятся в жидком растворе в высокой концентрации.

Однако жидкие водные высококонцентрированные препараты антител являются особенно сложными; вода действует как реагент или способствует переносу реагентов, приводящих к химической деградации и нестабильности белка. Не существует простого универсального протокола формулирования антител в высокой концентрации, и хотя

стабилизаторы могут способствовать уменьшению нестабильности и агрегации, их присутствие в высокой концентрации может влиять на другие физико-химические свойства конечного фармацевтического препарата, например, вязкость и осмоляльность.

Избегание или сведение к минимуму агрегации, осаждения или деградации остается важной задачей. Агрегация, с образованием растворимого вещества и/или нерастворимого преципитата, является особенной проблемой. Это может вызывать различные осложнения, например, образование агрегатов, которое может приводить к иммунным реакциям при введении и/или к сложностям в проведении надлежащего введения фармацевтического препарата, например, вследствие засорения устройства для введения.

Проблемы также могут возникать в процессе получения антитела в высокой концентрации, и технологичность препарата, то есть, то, как препарат ведет себя во время различных этапов производства, включая фильтрацию, замутнение и долгосрочная стабильность, является очень важным аспектом производства фармацевтических препаратов и дополнительной задачей, которая должна быть решена.

Исследования, проводимые при низких концентрациях антител, часто не дают ответ на то, как будет вести себя антитело, сформулированное при высокой концентрации. В зависимости от природы антитела и необходимых эксципиентов могут возникать непредвиденные сложности при крупномасштабном производстве.

Несомненно, для успешного получения фармацевтического препарата необходимо определять наилучшее сочетание данных факторов.

С учетом вышеизложенного, в данной области сохраняется потребность в создании более усовершенствованных фармацевтических композиций терапевтических антител.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение вышеуказанной потребности за счет предложения фармацевтических композиций, содержащих антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, с соответствующими физико-химическими свойствами.

Далее в настоящем документе описаны следующие пронумерованные конкретные варианты осуществления:

Вариант осуществления 1: Фармацевтическая композиция, содержащая:

- a. от примерно 80 мг/мл до примерно 200 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2;

- b. ацетат;
- c. глицин;
- d. полисорбат 80 и;

имеющая значение рН от примерно 4,6 до примерно 5,5 или от примерно 4,6 до примерно 5,3.

Вариант осуществления 2: Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 1, содержащая от примерно 120 мг/мл до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно примерно 160 мг/мл.

Вариант осуществления 3: Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, содержащая от примерно 0,01% до примерно 0,07% (масс/об) полисорбата 80.

Вариант осуществления 4: Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащая от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина.

Вариант осуществления 5: Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащая от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, и предпочтительно от примерно 40 мМ до примерно 90 мМ ацетата или от примерно 50 мМ до примерно 90 мМ ацетата.

Вариант осуществления 6: Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, при этом антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывает человеческий IL-17A и человеческий IL17F.

Вариант осуществления 7: Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащая:

- a. от примерно 120 мг/мл до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента;
- b. от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, предпочтительно от примерно 40 мМ до примерно 90 мМ ацетата или от примерно 50 мМ до примерно 90 мМ ацетата;
- c. от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина;
- d. от примерно 0,01% до примерно 0,07% (масс/об) полисорбата 80,

при этом композиция имеет значение рН от примерно 4,6 до примерно 5,5 или от примерно 4,6 до примерно 5,3.

Вариант осуществления 8: Способ получения фармацевтической композиции, включающий этапы:

а. получения низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5 или от примерно 4,6 до примерно 5,3;

б. получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе а), до концентрации от примерно 120 мг/мл до примерно 185 мг/мл;

с. добавления полисорбата 80 к высококонцентрированному препарату, полученному на этапе б);

д. необязательно, перед этапом с) корректировки концентрации антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5 или от примерно 4,6 до примерно 5,3.

Вариант осуществления 9: Способ по варианту осуществления 8, при этом буферный раствор содержит от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, предпочтительно от примерно 40 мМ до примерно 90 мМ ацетата или от примерно 50 мМ до примерно 90 мМ ацетата, и от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина, и при этом полисорбат 80 добавляют на этапе с) до достижения конечной концентрации от примерно 0,01 до примерно 0,07% (масс/об).

Вариант осуществления 10: Фармацевтическая композиция, полученная в соответствии с вариантом осуществления 8 или вариантом осуществления 9.

Вариант осуществления 11: Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 10, при этом значение pH композиции составляет от примерно 4,6 до примерно 5,5 или от примерно 4,6 до примерно 5,3.

Вариант осуществления 12: Контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 1-7, 10 или 11.

Вариант осуществления 13: Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-7, 10 или 11 для использования в терапии.

Вариант осуществления 14: Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-7, 10 или 11 для использования в лечении или профилактике патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с

повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F.

Вариант осуществления 15: Применение фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 1-7, 10 или 11 в производстве лекарственного препарата для лечения или профилактики патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F.

Вариант осуществления 16: Способ лечения или предотвращения патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F, у субъекта-млекопитающего, включающий введение фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 1-7, 10 или 11.

Вариант осуществления 17: Фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 14, применения по варианту осуществления 15 или способа по варианту осуществления 16, при этом патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, системного ювенильного идиопатического артрита (JIA), системной красной волчанки (SLE), астмы, хронической обструктивной болезни дыхательных путей, хронической обструктивной болезни легких, атопического дерматита, склеродермии, системной склеродермии, фиброза легких, болезни Крона, язвенного колита, анкилозирующего спондилита, аксиального спондилоартрита и других спондилоартропатий.

Вариант осуществления 18: Фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 14, применения по варианту осуществления 15 или способа по варианту осуществления 16, при этом патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и аксиального спондилоартрита.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к сочетанию полисорбата 80 и буферного раствора, содержащего ацетатный буфер (в виде буферного средства) и глицин (в виде цвиттериона) при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5, для получения подходящей для введения человеку фармацевтической композиции антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, в концентрации от 80 мг/мл до 200 мг/мл, без ущерба для технологичности фармацевтической композиции и долгосрочной стабильности антитела. Авторы изобретения установили, что фармацевтические композиции по изобретению сохраняют стабильность с течением времени, в частности, при хранении при 2-25°C, как показано, например, при 2-8°C и 25°C.

Термин «стабильный препарат» означает препарат, в котором интересующий белок (в настоящем документе антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент) практически сохраняет его физические, химические и/или биологические свойства в процессе хранения. Различные аналитические методы определения стабильности белка в препарате находятся в пределах компетентности специалиста в данной области (смотри некоторые примеры в разделе «Примеры»). Стабильность, как правило, оценивают при выбранной температуре (например, -70°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, 25°C , 35°C или более) в течение определенного периода времени (например, 3 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев или более). Поскольку антитело после формулирования, как правило, хранят в холодильнике (как правило, при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$) или при комнатной температуре (как правило, при температуре $15-25^{\circ}\text{C}$) до введения пациенту, важно, чтобы указанное сформулированное антитело сохраняло стабильность с течением времени по меньшей мере при $2-25^{\circ}\text{C}$, например, при $2-8^{\circ}\text{C}$ и 25°C . Можно использовать различные показатели для принятия решения о стабильности в течение конкретного периода времени (в сравнении с исходными данными), например (и без ограничения): 1) изменение не более, чем на 10%, содержания мономерной формы антитела, 2) увеличение не более, чем на 5%, содержания высокомолекулярных форм (ВМ или ВМФ; в настоящем документе также называемых агрегатами), 3) увеличение не более, чем на 10%, низкомолекулярных форм (НМ или НМФ), или 4) вариации значения рН не более, чем на $\pm 0,3$ единицы.

Во всех вариантах осуществления изобретения термин «фармацевтическая композиция» также может означать «стабильная фармацевтическая композиция», без какой-либо дифференциации.

В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция по изобретению предпочтительно содержит от, или от примерно, 80 мг/мл до, или до примерно, 200 мг/мл, предпочтительно от, или от примерно, 120 мг/мл до, или до примерно, 185 мг/мл или от, или от примерно, 120 мг/мл до, или до примерно, 180 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, например, примерно 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 мг/мл, более предпочтительно примерно 160 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению содержит от, или от примерно, 0,01% до, или до примерно, 0,07% (масс/об) полисорбата 80, например, примерно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 или 0,07% (масс/об полисорбата 80).

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению содержит от, или от примерно, 140 мМ до, или до примерно, 350 мМ глицина.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция по изобретению содержит от, или от примерно, 160 мМ до, или до примерно, 300 мМ глицина, например, примерно 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 мМ глицина. Глицин, в контексте настоящего изобретения в целом, не является буферным средством. Действительно, при значениях рН от примерно 4,6 до примерно 5,5 глицин является цвиттерионом. Как цвиттерион, он обладает способностью взаимодействовать с гидрофобными и гидрофильными частями антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, таким образом, возможно, уменьшая самовзаимодействие между антителами, или их антигенсвязывающими фрагментами, и обеспечивая стабилизирующий эффект.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению, в целом, содержит от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, и предпочтительно от примерно 40 мМ до примерно 90 мМ ацетата, например, примерно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 мМ ацетата. Альтернативно, фармацевтическая композиция по изобретению, в целом, содержит от примерно 50 мМ до примерно 90 мМ ацетата, например, примерно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 мМ ацетата. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит примерно 55 мМ ацетата. Ацетат, в контексте настоящего изобретения, в целом, является буферным средством. Можно использовать любые виды ацетатов, например, ацетат кальция, ацетат магния, ацетат натрия или ацетат цинка. Предпочтительно, используют ацетат натрия.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция по изобретению не содержит какой-либо сахар (например, моносахариды, дисахариды или полисахариды) или полиол.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, находящееся в фармацевтической композиции по изобретению, специфически связывает человеческий IL-17A и IL-17F.

Используемые в настоящем документе термины «специфически связывает человеческий IL-17A и IL-17F», «специфически связывающие человеческий IL-17A и IL-17F», и их эквиваленты, означают, что антитело будет связывать человеческий IL-17A и IL-17F с достаточной аффинностью и специфичностью для достижения биологически значимого эффекта. Выбранное антитело, как правило, будет иметь аффинность связывания для человеческого IL-17A и IL-17F, например, антитело может связывать человеческий IL-17A и IL-17F с величиной K_d , составляющей от 100 нМ до 1 пМ. Аффинность антител можно определять, например, в анализе поверхностного плазмонного резонанса, таком как анализ ВІАcore; в иммуноферментном анализе (ELISA); и в конкурентных анализах (например, РІА). В соответствии с идеями настоящего изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически

связывающее человеческий IL-17A и IL-17F, также может связывать другую молекулу, например, IL-17A и IL-17F яванского макака, или, в качестве неограничивающего примера, в случае, когда антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, является частью би- или мультиспецифического антитела. В частности, настоящее антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает никакую другую изоформу человеческого IL-17, кроме IL-17A, IL-17F, а также гетеродимера IL-17A и IL-17F.

IL-17A (исходное название CTLA-8) представляет собой провоспалительный цитокин и первый IL-17 из семейства IL-17, который был открыт. Впоследствии были идентифицированы 5 дополнительных представителей семейства (IL-17B - F). IL-17A и F имеют примерно 55% гомологию аминокислотных последовательностей, они экспрессируются в виде гомодимеров и в виде гетеродимеров, передают сигнал через рецепторы IL-17R, IL-17RC или IL-17RA/RC и, как установлено, связаны с целым рядом аутоиммунных заболеваний.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающее человеческий IL-17A и IL-17F, предпочтительно также нейтрализует человеческий IL-17A и IL-17F.

Используемый в настоящем документе термин «нейтрализует» означает, что антитело ингибирует или в значительной степени уменьшает биологический эффект молекулы, которую оно специфически связывает. Таким образом, выражение «антитело нейтрализует человеческий IL-17A и IL-17F» означает, что антитело специфически связывает человеческий IL-17A и IL-17F, и ингибирует или в значительной степени уменьшает их биологический эффект, например, за счет блокирования связывания IL-17A и IL-17F с их рецепторами.

Используемый в настоящем документе термин «антитело», или «антитела», относится к моноклональным или поликлональным антителам и не ограничен рекомбинантными антителами, которые получены рекомбинантными методами, известными в данной области.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, приведенные в Таблице 1, описано более подробно в WO2012095662, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «антитело», или «антитела», также относится к гуманизированным антителам. Гуманизированные антитела представляют собой антитела, которые содержат последовательность из не принадлежащего человеку антитела. В основном,

гуманизированные антитела представляют собой человеческие антитела (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области, или определяющей комплементарность области (CDR), антитела биологического вида, отличного от человека (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик, курица или примат, имеющего нужную специфичность, аффинность и активность. В большинстве случаев остатки человеческого (реципиентного) антитела за пределами CDR; то есть, в каркасной области (FR), также заменены соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации выполняются для дополнительного совершенствования функционирования антитела. Гуманизация приводит к уменьшению иммуногенности не принадлежащего человеку антитела у человека, таким образом, облегчая применение антител для лечения заболеваний человека. Гуманизированные антитела и несколько разных технологий их получения хорошо известны в данной области. Термин «антитело», или «антитела», также относится к человеческим антителам, которые могут быть получены в качестве альтернативы гуманизации. Например, можно получать трансгенных животных (например, мышей), которые способны при их иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител, без продуцирования эндогенных мышинных антител. Например, описано, что гомозиготная делеция гена соединительной области (JH) тяжелой цепи антитела у химерных и имеющих герминативные мутации мышей приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос набора человеческих генов иммуноглобулинов зародышевой линии таким имеющим герминативные мутации мышам приведет к продуцированию человеческих антител со специфичностью в отношении конкретного антигена при иммунизации указанным антигеном трансгенного животного, несущего человеческие гены иммуноглобулинов зародышевой линии. Технологии получения таких трансгенных животных, и технологии выделения и получения человеческих антител от таких трансгенных животных, известны в данной области. Альтернативно, у трансгенного животного, например, мыши, только гены иммуноглобулинов, кодирующие вариабельные области мышинных антител, заменяют соответствующими последовательностями человеческих генов для вариабельных областей иммуноглобулинов. Мышинные гены иммуноглобулинов зародышевой линии, кодирующие константные области антител, остаются неизменными. В этом случае эффекторные функции антител в иммунной системе трансгенной мыши и, следовательно, развитие В-клеток, практически не меняются, что может приводить к улучшенному ответу в виде выработки антител при

иммунизации антигеном *in vivo*. После выделения генов, кодирующих конкретное интересующее антитело, из организма таких трансгенных животных, гены, кодирующие константные области, можно заменять генами константных областей человеческих антител для получения полностью человеческого антитела. Используемый в настоящем документе термин «антитело», или «антитела», также относится к агликозилированному антителу.

Используемый в настоящем документе термин «его антигенсвязывающий фрагмент», или его грамматические вариации, относится к фрагменту антитела. Примеры фрагментов антител по изобретению включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, scFv фрагменты, одноцепочечные антитела, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические или мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител или антител, включая, но без ограничения, конструкторы Fab-Fv или Fab-Fv-Fv. Фрагменты антител, описанные выше, известны в данной области.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция по изобретению содержит (Таблица 1):

- 1) антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2
- 2) антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; или
- 3) антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно, 90% идентичность или сходство, с вариабельной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно, 90% идентичность или сходство, с вариабельной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4.

Таблица 1

Область и SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
Вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDYNMAWVRQ APGKGLEWVATITYEGRNTYYRDSVKGRFTISRДHKKNSL YLQMNSLRAЭДТАVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQ GTLVTVSS
Вариабельная область	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRADESVRTLМHWYQQKP

легкой цепи SEQ ID NO: 2	GKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRFSGSGSGTDFRLTISSLQPED FATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIK
Тяжелая цепь SEQ ID NO: 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQ APGKGLEWVATITYEGRNTYYRDSVKGRFTISRДHKKNSL YLQMNSLRAЭДТАVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG(K)* <i>* Последний остаток К может отсутствовать</i>
Легкая цепь SEQ ID NO: 4	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRADESVRTLMDHWYQQKPK GKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRFSGSGSGTDFRLTISSLQPED FATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWКVДНKLQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYЕКHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

Молекулы антител, как правило, можно получать путем культивирования клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий последовательность антитела, в условиях, подходящих для, и приводящих к, экспрессии белка с ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделения молекулы антитела.

Для получения продуктов, содержащих как тяжелую, так и легкую, цепи, линейные клетки можно трансфицировать двумя векторами, первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, можно использовать один вектор, содержащий последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое может быть произведено в промышленном масштабе, может быть получено путем культивирования эукариотических клеток-хозяев, трансфицированных одним или более экспрессионными векторами, кодирующими фрагмент рекомбинантного антитела. Эукариотические клетки-хозяева предпочтительно представляют собой клетки млекопитающих, более

предпочтительно, клетки яичника китайского хомяка (СНО).

Клетки млекопитающих можно культивировать в любой среде, которая будет поддерживать их рост и экспрессию рекомбинантного белка, предпочтительно, среда представляет собой среду с определенным химическим составом, не содержащую продуктов животного происхождения, таких как животная сыворотка и пептон. Существуют различные среды для культивирования клеток, доступные специалистам в данной области, содержащие в разных сочетаниях витамины, аминокислоты, гормоны, факторы роста, ионы, буферы, нуклеозиды, глюкозу, или эквивалентный источник энергии, присутствующие в соответствующих концентрациях для обеспечения роста клеток и продуцирования белков. Дополнительные компоненты среды для культивирования клеток можно включать в среду для культивирования клеток в соответствующих концентрациях в разные моменты времени во время цикла культивирования клеток, как известно специалистам в данной области.

Клетки млекопитающих можно культивировать в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или биореактор, для функционирования которого может быть использован, или не использован, режим периодического культивирования с подпиткой, в зависимости от необходимого масштаба производства. Эти биореакторы могут представлять собой либо реакторы с механическим перемешиванием, либо аэролифтные реакторы. Доступны различные крупномасштабные биореакторы емкостью от 1000 л до 50000 л, предпочтительно от 5000 л до 20000 л или до 10000 л. Альтернативно, также можно использовать биореакторы меньшего масштаба, например, емкостью от 2 л до 100 л, для производства антитела или фрагмента антитела.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, как правило, находится в супернатанте культуры клеток-хозяев млекопитающих, как правило, культуры клеток СНО. Для обработки культуры клеток СНО, когда интересующий белок, такой как антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, секретируется в супернатант, указанный супернатант собирают методами, известными в данной области, как правило, центрифугированием.

Таким образом, способ получения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, включает этап центрифугирования и сбора супернатанта после культивирования клеток и до очистки белка. В следующем конкретном варианте осуществления указанное центрифугирование представляет собой непрерывное центрифугирование. Во избежание сомнений, супернатант представляет собой жидкость над осажденными клетками, возникающую вследствие центрифугирования клеточной культуры.

Альтернативно, клетки-хозяева представляют собой прокариотические клетки, предпочтительно грамотрицательные бактерии. Более предпочтительно, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli*. Прокариотические клетки-хозяева, используемые для экспрессии белка, хорошо известны в данной области (Terpe, K. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 211-222 (2006)). Клетки-хозяева представляют собой рекомбинантные клетки, которые были генетически модифицированы для продуцирования интересующего белка, такого как антигенсвязывающий фрагмент антитела. Рекомбинантные клетки-хозяева *E. coli* могут быть получены из клеток любого подходящего штамма *E. coli*, в том числе, из MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue и JM109. Одним примером является штамм W3110 *E. coli* (ATCC 27325), обычно используемый штамм-хозяин для получения рекомбинантных белков в процессе ферментации. Фрагменты антител также могут быть получены путем культивирования модифицированных штаммов *E. coli*, например, метаболических мутантов или дефицитных по протеазе штаммов *E. coli*.

Культуры клеток-хозяев *E. coli* (ферментационные культуры) можно культивировать в любой среде, которая будет поддерживать рост *E. coli* и экспрессию рекомбинантного белка. Среда может представлять собой любую среду с определенным химическим составом, такую как, например, среда, описанная в публикации Durany O, et al. (2004). *Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in Escherichia coli*. *Process Biochem* 39, 1677-1684.

Культивировать клетки-хозяева *E. coli* можно в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или биореактор, в зависимости от необходимого масштаба производства. Доступны различные крупномасштабные биореакторы емкостью от более чем 1000 литров вплоть до примерно 100000 литров. Предпочтительно, используют биореакторы емкостью от 1000 до 50000 литров, более предпочтительно от 1000 до 25000, 20000, 15000, 12000 или 10000 литров. Также можно использовать биореакторы меньшего масштаба емкостью от 0,5 до 1000 литров.

Другие способы получения антигенсвязывающего фрагмента человеческого антитела *in vitro* основаны на технологиях дисплея, таких как технологии фагового дисплея или рибосомного дисплея, при этом используют библиотеки рекомбинантных ДНК, которые либо созданы, по меньшей мере частично, искусственно, либо получены из репертуара генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов от разных доноров. Технологии фагового и рибосомного дисплея для получения человеческих антител хорошо известны в данной области. Человеческие антитела также могут быть получены из выделенных человеческих В-клеток, которые были *ex vivo* иммунизированы интересующим антигеном, с последующим слиянием для получения гибридом, которые

затем могут быть подвергнуты скринингу на оптимальное человеческое антитело.

Специалисты в данной области понимают, что антитела могут подвергаться различным посттрансляционным модификациям. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, используемых для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации в гликозилировании, окислении метионина, образовании дикетопиперазина, изомеризации аспартата и дезамидировании аспарагина. Частой модификацией является утрата карбокси-концевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) в результате действия карбоксипептидаз (как описано в публикации Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Соответственно, С-концевой остаток лизина тяжелой цепи антитела может отсутствовать.

Фармацевтическая композиция по изобретению, в целом, имеет значение pH от примерно 4,6 до примерно 5,5, например, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 или 5,5. Альтернативно, она имеет значение pH от примерно 4,6 до примерно 5,3, например, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2 или 5,3. Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения, если нет иных указаний, значение pH измеряли при 23-25°C, и оно варьировалось в пределах $\pm 0,1$ или $\pm 0,2$ единицы pH.

Настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2. Способ включает этапы получения а) низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5; и затем б) получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе а), до концентрации от примерно 160 мг/мл до 180 мг/мл; и наконец, с) добавления полисорбата 80 в высококонцентрированный препарат, полученный на этапе б). Необязательно, перед этапом с) концентрация антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, может быть скорректирована при помощи буферного раствора, содержащего глицин и ацетат.

Дополнительные эксципиенты для использования в фармацевтических композициях по изобретению включают, но без ограничения, повышающие вязкость средства, наполнители, солюбилизующие средства или их сочетания.

Настоящее изобретение также относится к контейнеру, содержащему

фармацевтическую композицию по изобретению. В частности, контейнер может представлять собой, без каких-либо ограничений, флакон, ампулу, пробирку, бутылку или шприц (например, предварительно заполненный шприц) с фармацевтической композицией.

Контейнер может являться частью набора деталей, включающего один или более контейнеров, содержащих фармацевтические композиции по изобретению, устройства для доставки, такие как шприц, предварительно заполненный шприц, шприц-ручка, безыгольное устройство, имплантат или пластырь, или другие устройства для парентерального введения, и инструкции по применению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения контейнер содержит фармацевтическую композицию, содержащую:

a. от примерно 80 мг/мл до примерно 200 мг/мл, альтернативно, от примерно 120 мг/мл до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего:

i. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2; или

ii. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4; или

iii. тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4.

b. ацетат;

c. глицин;

d. полисорбат 80,

при этом композиция имеет значение pH от примерно 4,6 до примерно 5,5.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контейнер содержит фармацевтическую композицию, содержащую:

a. примерно 160 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего:

i. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2; или

ii. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4; или

iii. тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4.

b. ацетат натрия;

c. глицин;

d. полисорбат 80,

при этом композиция имеет значение pH от примерно 4,6 до примерно 5,5.

Также предпочтительно, настоящее изобретение относится к контейнеру, содержащему фармацевтическую композицию, получаемую способом по настоящему изобретению, который включает этапы:

a. получения низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5;

b. получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе a), до концентрации от примерно 160 мг/мл до 180 мг/мл;

c. добавления полисорбата 80 к высококонцентрированному препарату, полученному на этапе b), предпочтительно в концентрации от примерно 0,01 до 0,07% (масс/об);

d. необязательно, перед этапом c) корректировки концентрации антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, буферным раствором, содержащим глицин и ацетат.

Фармацевтическая композиция, полученная способом по настоящему изобретению и находящаяся в контейнере, имеет значение pH от примерно 4,6 до 5,5.

Предпочтительно, буферный раствор содержит от примерно 20 mM до примерно 100 mM ацетата, предпочтительно от примерно 40 mM до примерно 90 mM ацетата, и от

примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина.

Фармацевтические композиции, или жидкие фармацевтические препараты, по изобретению предназначены для использования в терапии.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция для использования в терапии содержит от 80 мг/мл до 200 мг/мл, предпочтительно от примерно 120 до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, ацетат, глицин, полисорбат 80 при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5;

при этом антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент (в случае его использования), содержит:

- 1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2; или
- 2) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4; или
- 3) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4;

предпочтительно от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина и от примерно 0,01% до примерно 0,07% (масс/об) полисорбата 80 при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция для использования в терапии получена способом по настоящему изобретению, который включает этапы:

а. получения низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5;

б. получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе а), до концентрации от примерно 160 мг/мл до 180 мг/мл;

c. добавления полисорбата 80 к высококонцентрированному препарату, полученному на этапе b), предпочтительно в концентрации от примерно 0,01 до 0,07 (масс/об)%;

d. необязательно, перед этапом c) корректировки концентрации антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, буферным раствором, содержащим глицин и ацетат.

Фармацевтическая композиция по изобретению также предназначена для использования в лечении или профилактике патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция для использования в лечении или профилактике патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F, содержит от 80 мг/мл до 200 мг/мл, предпочтительно от примерно 120 до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, ацетат, глицин, полисорбат 80 при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5;

при этом антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент (в случае его использования), содержит:

1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2; или

2) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4; или

3) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4;

предпочтительно от примерно 20 mM до примерно 100 mM ацетата, от примерно 140 mM до примерно 350 mM глицина и от примерно 0,01% до примерно 0,07% (масс/об) полисорбата 80 при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5.

В одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтическую композицию для использования в лечении или профилактике патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F, получают способом по настоящему изобретению, включающим этапы:

а. получения низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5;

б. получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе а), до концентрации от примерно 160 мг/мл до 180 мг/мл;

в. добавления полисорбата 80 к высококонцентрированному препарату, полученному на этапе б), предпочтительно в концентрации от примерно 0,01 до примерно 0,07 (масс/об)%;

г. необязательно, перед этапом в) корректировки концентрации антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, буферным раствором, содержащим глицин и ацетат.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции в производстве лекарственного препарата для лечения или профилактики патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F, при этом фармацевтическая композиция содержит от примерно 80 мг/мл до примерно 200 мг/мл, предпочтительно от примерно 120 до примерно 180 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, ацетат, глицин, полисорбат 80 при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5;

при этом антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент (в случае его использования), содержит:

- 1) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2; или
- 2) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4; или
- 3) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4;

предпочтительно от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата натрия, от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина и от примерно 0,01 до примерно 0,07(масс/об)% полисорбата 80 при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции в производстве лекарственного препарата для лечения или профилактики патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F, при этом фармацевтическую композицию получают способом по настоящему изобретению, включающим этапы:

a. получения низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5;

b. получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе a), до концентрации от примерно 160 мг/мл до 180 мг/мл;

c. добавления полисорбата 80 к высококонцентрированному препарату, полученному на этапе b), предпочтительно в концентрации от примерно 0,01 до примерно 0,07 (масс/об)%;

d. необязательно, перед этапом c) корректировки концентрации антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, буферным раствором, содержащим глицин и ацетат.

По настоящему изобретению также предусмотрен способ лечения или предотвращения патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F, у субъекта-млекопитающего, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей от примерно 80 мг/мл до примерно 200 мг/мл, предпочтительно от примерно 120 до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, ацетат, глицин, полисорбат 80 при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5;

при этом антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент (в случае его использования), содержит:

1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2; или

2) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4; или

3) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4;

предпочтительно от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, от примерно 150 мМ до примерно 250 мМ глицина и от примерно 0,01 до примерно 0,07 (масс/об)% полисорбата 80 при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5.

Предпочтительно, патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из инфекции (вирусной, бактериальной, грибковой и паразитарной), эндотоксинового шока, связанного с инфекцией, артрита, ревматоидного артрита, псориатического артрита, системного ювенильного идиопатического артрита (JIA), системной красной волчанки (SLE), астмы, хронической обструктивной болезни дыхательных путей (COAD), хронической обструктивной болезни легких (COPD), острого повреждения легких, воспалительного заболевания органов таза, болезни Альцгеймера, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженной кишки, язвенного колита, болезни Кастлемана, анкилозирующего спондилита, аксиального спондилоартрита и других спондилоартропатий, дерматомиозита, миокардита, увеита, экзофтальма, аутоиммунного тиреоидита, болезни Пейрони, целиакии, болезни желчного пузыря, пилонидальной болезни, перитонита, псориаза, атопического дерматита, васкулита, послеоперационных спаек, инсульта, аутоиммунного диабета, диабета I типа, артрита Лайма, менингоэнцефалита, опосредованных иммунной системой воспалительных заболеваний центральной и периферической нервной системы, таких как рассеянный склероз и синдром Гийена-Барре, других аутоиммунных заболеваний, панкреатита, травмы (операции), реакции трансплантат против хозяина, отторжения трансплантата, фиброзирующих заболеваний, включая фиброз легких, фиброз печени, фиброз почек, склеродермии или системной склеродермии, рака (как солидных опухолей, таких как меланомы, гепатобластомы, саркомы, плоскоклеточный рак, переходно-клеточный рак, рак яичника, так и гематологических злокачественных новообразований, и, в частности, острого миелогенного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, хронического

лимфолейкоза, рака желудка и рака толстого кишечника), заболеваний сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероза, внутрисосудистой коагуляции, резорбции костей, остеопороза, периодонтита и гипохлоргидрии.

Более предпочтительно, патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, системного ювенильного идиопатического артрита (JIA), системной красной волчанки (SLE), астмы, хронической обструктивной болезни дыхательных путей, хронической обструктивной болезни легких, атопического дерматита, склеродермии, системной склеродермии, фиброза легких, болезни Крона, язвенного колита, анкилозирующего спондилита, аксиального спондилоартрита и других спондилоартропатий; и даже более предпочтительно, патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, болезни Крона, язвенного колита, анкилозирующего спондилита и аксиального спондилоартрита.

Еще более предпочтительно, патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и аксиального спондилоартрита.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция предназначена для использования в лечении или профилактике ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и аксиального спондилоартрита, и содержит примерно 160 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, ацетат, глицин, полисорбат 80 при рН от примерно 4,6 до примерно 5,5;

при этом антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент (в случае его использования), содержит:

- 1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2; или
- 2) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4; или
- 3) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80% идентичность или сходство, предпочтительно 90% идентичность или сходство, с константной областью последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для использования в лечении или профилактике ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и аксиального спондилоартрита, при этом фармацевтическую композицию получают способом по настоящему изобретению, включающим этапы:

а. получения низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5;

б. получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе а), до концентрации от примерно 160 мг/мл до 180 мг/мл;

с. добавления полисорбата 80 к высококонцентрированному препарату, полученному на этапе б), предпочтительно в концентрации от примерно 0,01 до примерно 0,07 (масс/об)%;

д. необязательно, перед этапом с) корректировки концентрации антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, буферным раствором, содержащим глицин и ацетат.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить в терапевтически эффективном количестве. Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» означает количество терапевтического средства (то есть, антитела), необходимое для лечения, облегчения или предотвращения целевого заболевания, нарушения или состояния, или для оказания поддающегося обнаружению терапевтического, фармакологического или превентивного эффекта. Для любого антитела, или его антигенсвязывающих фрагментов, терапевтически эффективное количество может быть сначала оценено либо в анализах на клеточных культурах, либо на животных моделях, как правило, на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Животную модель также можно использовать для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Затем такую информацию можно использовать для определения полезных доз и путей введения для человека.

Точное терапевтически эффективное количество для субъекта-человека будет

зависеть от степени тяжести заболевания, общего состояния здоровья субъекта, возраста, массы тела и пола субъекта, диеты, времени и частоты введения, сочетания(ий) лекарственных средств, аллергических реакций и переносимости/ответа на терапию. Такое количество может быть определено путем рутинного экспериментирования и остается на усмотрение лечащего врача. В целом, терапевтически эффективное количество антитела будет составлять от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, например, от 0,1 мг/кг до 200 мг/кг или от 1 до 100 мг/кг.

Для лечения вышеуказанных заболеваний и/или нарушений соответствующая доза будет варьироваться в зависимости, например, от конкретного используемого антитела, получающего лечение субъекта, способа введения, а также от характера и степени тяжести подвергаемого лечению заболевания. В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию по изобретению вводят внутривенным или подкожным путем введения. При введении путем внутривенной инъекции композицию можно вводить в виде болюсной инъекции или в виде непрерывной инфузии. Фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления изобретения также можно вводить внутримышечной инъекцией. Фармацевтическую композицию можно вводить инъекцией при помощи шприца, инъекционного устройства, такого как шприц-ручка, безыгольного устройства, имплантата или пластыря.

Жидкий фармацевтический препарат по изобретению предпочтительно вводят пациенту однократно или в виде серии процедур, и можно вводить пациенту в любое время после постановки диагноза; его можно вводить в качестве единственного препарата или в сочетании с другими лекарственными средствами или видами терапии, полезными для лечения состояний, описанных выше в настоящем документе.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть единственным активным ингредиентом в жидком фармацевтическом препарате. Альтернативно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить в сочетании, например, одновременно, последовательно или отдельно, с одним или более другими терапевтически активными ингредиентами. Используемый в настоящем документе термин «активный ингредиент» означает ингредиент, оказывающий фармакологический эффект, такой как терапевтический эффект, в соответствующей дозе. В некоторых вариантах осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в фармацевтической композиции может присутствовать в сочетании с другими активными ингредиентами, включая другие антитела или не являющиеся антителами ингредиенты, вводимыми тем же, или другим, путем введения для лечения других воспалительных или аутоиммунных заболеваний. В одном варианте осуществления субъекту вводят одновременно или

последовательно (до и/или после) другие ингредиенты, представляющие собой антитела, такие как анти-TNF антитела, или не являющиеся антителами ингредиенты, такие как низкомолекулярные лекарственные средства.

Далее изобретение будет описано при помощи примеров со ссылкой на варианты осуществления, проиллюстрированные в сопроводительных чертежах.

ПРИМЕРЫ

Сокращения

Анти-IL-17A/F Ат: антитело против IL-17A и IL-17F, имеющее последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 3 и 4 в Таблице 1; УЗР: ускоренное замораживание/размораживание; ОПБ: опытное предприятие для производства биопрепаратов; НПКК: научный процесс культивирования клеток; КОХ-ВЭЖХ: катионообменная хроматография – высокоэффективная жидкостная хроматография; КИЭФ: капиллярное изоэлектрическое фокусирование; ДРС: динамическое рассеяние света; ДСФ: дифференциальная сканирующая флуориметрия; НППП: научные основы последующего технологического процесса; ДТТ: дитиотреитол; З/Р: замораживание/размораживание; ВМ: высокомолекулярные; ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография; HSC™: высокоэффективная хроматография самовзаимодействия; IAA: йодацетамид; КЭВ: капиллярный электрофорез с визуализацией; НМ: низкомолекулярные; ММ: молекулярная масса; Н/П: не применимо; ПЦР: полимеразная цепная реакция; PEG: полиэтиленгликоль; PES: полиэфирсульфон; PS20: полисорбат 20; PS80: полисорбат 80; PTFE: политетрафторэтилен; PVDF: поливинилиденфторид; RH: относительная влажность; %RSD: % относительное стандартное отклонение; SDS-ПААГ: электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; с: секунды; ЭХ: эксклюзионная хроматография; ЭХ-ВЭЖХ: эксклюзионная хроматография – высокоэффективная жидкостная хроматография; ХСВ: хроматография самовзаимодействия; Тгр: Триптофан; WFI: вода для инъекций; масс/об: масса/объем.

Пример 1: Скрининг вспомогательных компонентов

Проводили начальные скрининговые исследования, выясняя эффект разных вспомогательных компонентов на антитело против IL-17A и IL-17F в концентрации 1 мг/мл путем определения величины В22 (второго вириального коэффициента) методом ХСВ и выбирая 5 лучших препаратов с наибольшей вероятностью успеха (технология HSC™). Положительные значения В22 свидетельствуют о том, что вспомогательный компонент способен более эффективно смягчать последствия белок-белковых взаимодействий, которые могут приводить к агрегации и другим видам деградации в

препарате, содержащем анти-IL-17A/F Ат.

Проводили скрининг разных вспомогательных компонентов. Были идентифицированы лучшие вспомогательные компоненты, которые приводили к наивысшим значениям В22, при этом не нарушая конформационную стабильность антител. На основании неполного факторного дизайна возможных сочетаний лучших 9 вспомогательных компонентов и 3 буферных систем были созданы 36 препаратов, и были измерены соответствующие значения В22 при помощи технологии HSC™ (Soluble Therapeutics™).

На основании результатов анализа этих 36 препаратов были предсказаны и валидированы 5 препаратов (Таблица 2) методом ХСВ (данные не представлены). В Таблице 2 М означает измеренное значение В22 и С означает рассчитанное значение В22.

Таблица 2

					М	С
1	0,04 М Цитрат pH 5,5	3 мМ КН ₂ РО ₄	1,5% (масс/об) PEG 3350		3,8	3,6
2	0,04 М Цитрат pH 5,5	50 мМ К ₂ НРО ₄	35 мкМ PS20	75 мМ Сахароза	3,5	3,4
3	0,04 М Ацетат pH 5,7	15 мМ NaOAc	0,1% (масс/об) Бензиловый спирт	100 мМ Сахароза	2,9	2,7
4	0,04 М Цитрат pH 5,5	25 мМ К ₂ НРО ₄	17,5 мкМ PS20	100 мМ Сахароза	2,8	2,5
5	0,04 М Ацетат pH 5,7	25 мМ К ₂ НРО ₄	125 мМ Сахароза		2,8	2,4

Пример 2: Эффект высокой концентрации антитела на лучшие препараты

Описанные в примере 1 результаты исследования, проведенного с анти-IL-17A/F Ат в концентрации 1 мг/мл, впоследствии были подтверждены с анти-IL-17A/F Ат в концентрации примерно 160 мг/мл и, как показано, являлись репрезентативными.

Препараты, которые были включены в скрининг, являлись следующими (Таблица 3):

Таблица 3

1	40 мМ Цитрат натрия pH 5,6	3 мМ КН ₂ РО ₄	1,5% (масс/об) PEG 3350	
---	-------------------------------	---	----------------------------	--

		недели	недели	неделя	неделя	неделя	
5°C	✓ ^a	✓	✓	✓ ^c	✓	✓	✓
25°C/60%RH		✓	✓	✓ ^c	✓	✓	✓
35°C/75%RH		✓	✓	✓ ^c	✓	✓	✓
З/Р			✓ ^b		✓ ^c		
УЗР	✓ ^b		✓ ^{c, d}				

Препарат подвергали стрессу, вызываемому замораживанием/размораживанием, путем замораживания/размораживания препарата пять раз с использованием программируемой морозильной камеры Cryomed, со скоростями замораживания и размораживания, установленными на 0,5°C/мин в эксперименте с медленным замораживанием/размораживанием (З/Р) и 2°C/мин в эксперименте с ускоренным замораживанием/размораживанием (УЗР). В каждом случае датчик морозильной камеры вставляли в лунку дополнительного планшета, содержащего водный раствор глицерина с вязкостью, аналогичной вязкости образцов. Анализ З/Р проводили через 4 недели при 5°C для препарата 1 и через 8 недель при 5°C для препаратов 2-6. Анализ УЗР проводили через 1 неделю при 5°C для препарата 1 и через 5 недель при 5°C для препаратов 2-6.

Визуальная оценка

Планшеты сканировали на сканере Epson Scanner Expression v750 Pro model J221A в цветовом режиме (1200 точек на дюйм, 24 бит, без обработки изображения) и в сером цветовом режиме (1200 точек на дюйм, 16 бит, без обработки изображения). Автоматизированное визуальное сканирование проводили с использованием планшетного ридера Molecular Devices M5, выполняющего 1-точечное сканирование лунки с измерением оптической плотности при 600 нм.

При визуальной инспекции во всех временных точках и при всех условиях препарат 1 всегда выглядел более мутным, чем все остальные препараты. При измерении A_{600} при всех условиях в препаратах 1 и 2 наблюдалось увеличение поглощения при 600 нм (Таблица 8), однако это увеличение было незначительным. После З/Р и УЗР стресса в препарате 1 наблюдалось увеличение поглощения при 600 нм (Таблица 5), с менее выраженным увеличением после УЗР стресса.

Таблица 5

Условия	Временная точка (недели)	Препараты					
		1	2	3	4	5	6
5°C	1 начальное	0,10	0,09	0,08	0,12	0,10	0,13
	104	0,12	0,20	0,09	0,12	0,08	0,10
	108	0,16	0,20	0,13	0,11	0,08	0,10

	T12	H/Г*	0,21	0,09	0,08	0,08	0,09
25°C/60%RH	T начальное	0,10	0,09	0,08	0,12	0,10	0,13
	T04	0,27	0,15	0,09	0,09	0,10	0,07
	T08	0,10	0,24	0,18	0,15	0,15	0,09
	T12	H/Г*	0,24	0,12	0,11	0,15	0,09
35°C/75%RH	T начальное	0,10	0,09	0,08	0,12	0,10	0,13
	T04	0,19	0,16	0,14	0,10	0,10	0,08
	T08	0,16	0,19	0,11	0,25	0,15	0,11
	T12	H/Г*	0,22	0,15	0,17	0,14	0,11
З/Р	T начальное	0,10	0,09	0,08	0,12	0,10	0,13
	T04	0,25	-	-	-	-	-
	T08	-	0,21	0,12	0,13	0,09	0,11
УЗР	T начальное	0,10	0,09	0,08	0,12	0,10	0,13
	T04	0,15	0,20	0,11	0,14	0,10	0,10

Определение концентрации белка по УФ-поглощению при 280 нм

Образцы разбавляли до номинальной концентрации 20 мг/мл, затем до номинальной концентрации 0,5 мг/мл фильтрованной деионизированной водой. Концентрацию определяли путем измерения поглощения при 280 нм, в сочетании со стандартной кривой, в плоскодонном пропускающим УФ свет 96-луночном планшете с коэффициентом экстинкции 1,56 мл/(мг*см), используя планшетный ридер Molecular devices M5 (объем образца: 100 мкл).

Какие-либо тенденции к уменьшению или увеличению в этих данных отсутствовали на протяжении исследования (Таблица 6А).

Таблица 6А

Условия	Временная точка (недели)	Препараты					
		1	2	3	4	5	6
5°C	T начальное	162,8	171,1	170,5	168,7	174,8	169,2
	T04	159,0	196,2	208,4	193,6	195,8	192,2
	T08	150,9	177,7	191,8	169,9	179,0	178,1
	T12	-	141,9	158,9	136,8	144,5	150,9
25°C/60%RH	T начальное	162,8	171,1	170,5	168,7	174,8	169,2
	T04	162,9	196,1	206,0	189,6	210,9	185,3
	T08	165,6	189,1	203,1	177,1	196,4	180,8
	T12	-	195,1	162,9	152,6	197,8	165,6
35°C/75%RH	T начальное	162,8	171,1	170,5	168,7	174,8	169,2
	T04	169,1	195,0	217,5	192,9	205,0	181,4

	T08	168,8	208,4	191,4	182,0	200,0	211,6
	T12	-	184,3	163,2	160,0	186,2	168,8
З/Р	T начальное	162,8	171,1	170,5	168,7	174,8	169,2
	T04	160,1	-	-	-	-	-
	T08	-	176,5	188,9	175,8	187,0	182,7
УЗР	T начальное	162,8	171,1	170,5	168,7	174,8	169,2
	T04	169,2	177,2	183,0	177,3	176,2	178,8

Измерение pH

Значение pH определяли на pH-метре Mettler Toledo S47 при 23-25°C. Перед измерением разбавление не производили.

Для образцов, хранившихся при 5°C, в течение всего исследования значение pH всех препаратов находилось в пределах 0,2 единиц pH от исходного значения (Таблица 6В).

Таблица 6В

		Буферы					
		1А	2	3	4	5	6
		5,57	5,55	5,75	5,49	5,70	5,53
Условия	Временная точка	Препараты					
		1	2	3	4	5	6
5°C	T начальное	5,56	5,55	5,89	5,51	5,76	5,56
	T04	5,60	5,54	5,92	5,54	5,76	Н/П ^а
	T08	5,74	5,56	5,90	5,58	5,77	5,57
	T12	Н/П ^а	5,55	5,91	5,69	5,76	5,55
25°C/60%RH	T начальное	5,56	5,55	5,89	5,51	5,76	5,56
	T04	8,39	5,55	5,88	5,89	5,76	5,49
	T08	8,17	5,63	5,96	6,07	5,79	5,68
	T12	Н/П ^а	Н/П ^а	5,96	6,56	Н/П ^а	Н/П ^а
35°C/75%RH	T начальное	5,56	5,55	5,89	5,51	5,76	5,56
	T04	7,48	5,55	5,90	6,50	5,76	5,58
	T08	8,66	5,71	6,00	Н/П ^а	5,87	5,90
	T12	Н/П ^а	Н/П ^а	6,44	8,25	Н/П ^а	5,62
З/Р	T начальное	5,56	5,55	5,89	5,51	5,76	5,56
	T04	5,56	-	-	-	-	-
	T08	-	5,55	5,90	5,60	5,78	5,57
УЗР	T начальное	5,56	5,55	5,89	5,51	5,76	5,56
	T04	5,58	5,56	5,89	5,59	5,77	5,57

а: в планшете не осталось образца; б: препарат 1 пришлось готовить заново, что нарушило время сбора образца в T12.

В препарате 3 начальное значение было на 0,14 выше, чем значение у одного только буфера, это указывает на то, что в данном буфере антитело вызывает повышение значения рН. В препаратах 1 и 4, хотя значение рН находилось в пределах 0,2 единиц рН от исходного значения, судя по всему, имела место тенденция к постепенному увеличению на протяжении 2 и 3 месяцев, соответственно, которая не наблюдалась в других препаратах. В случае образцов, хранившихся при 25°C, в течение исследования значение рН в препаратах 2, 3, 5 и 6 находилось в пределах 0,2 единиц рН, при этом в образцах 2, 5 и 6 определение было невозможным в T12 вследствие отсутствия остатка образца. В случае образцов, хранившихся при 25°C, в препаратах 1 и 4 значительное увеличение значения рН можно было наблюдать, начиная с T04 и далее при 25°C и 35°C, что свидетельствовало о деградации или о загрязнении образца. В случае образцов, хранившихся при 35°C, в препаратах 2, 5 и 6 наблюдались значения рН в пределах 0,2 единиц рН от исходного значения, с выбивающимся из тенденции значением, наблюдаемым в T08 в препарате 6. Из-за отсутствия оставшегося образца для измерения в T12 в случае препаратов 2 и 5 не могли быть сделаны выводы о возможности увеличения значения рН с течением времени, поскольку значения все еще оставались в пределах 0,2 единиц рН от исходного значения. В препарате 3 в T12 наблюдалось аномальное увеличение значения рН.

Эксклюзионная хроматография

Проводили анализы аликвот образцов, разбавленных до концентрации 5 мг/мл в фильтрованной подвижной фазе (0,2 М Na-фосфат рН 7,0), методом ВЭЖХ на приборе Agilent 1200 серии с использованием автодозатора для 96-луночных планшетов. Анализы проводили следующим образом:

- Нагрузка образца: 50 мкл (250 мкг) с концентрацией 5 мг/мл
- Колонка: Tosoh BioScience TSK Gel G3000 SWXL, 250 Å, 5 мкм, 7,8x300 мм (номер партии: 8541)
- Элюент А: 0,2 М фосфат натрия, рН 7,0
- Скорость потока: 1 мл/мин
- Детекция: УФ (длина волны: 280 нм, разрешение: 8 нм, эталон: выкл.)
- Температура колонки: 25°C
- Температура образца: 4°C
- Градиент: изократический
- Максимальное давление: 70 бар
- Время прогона: 15 мин
- Время перерыва: 5 мин

Анализ данных проводили с использованием программы Empower 2.

Данные по увеличению % содержания ВМ вариантов при ЭХ для препаратов 1-6 в сравнении с эталонными препаратами DS (анти-IL-17A/F Ат в концентрации 80 мг/мл в буфере 20 мМ гистидин, 250 мМ сорбит, 0,02% полисорбат 80, pH 6,0) и DP (те же, что и DS, но упакованные в стеклянном флаконе) приведены в Таблице 7.

В случае образцов, хранившихся при 5°C, через 12 недель в препаратах 2, 4, 5 и 6 наблюдали аналогичную степень агрегации в сравнении с препаратами DS и DP, при этом в препарате 3 наблюдали большее увеличение агрегации в сравнении с препаратами DS и DP. Образование фрагментов было минимальным в препаратах 2, 3, 5 и 6 (данные не представлены).

В случае образцов, хранившихся при 5°C, препарат 3 демонстрировал лучшие показатели, хотя все препараты имели худшие показатели в сравнении с препаратами DS и DP. Во всех препаратах наблюдалось увеличение уровней фрагментации (данные не представлены). В препарате 2 наблюдалось уменьшение % содержания ВМ вариантов через 12 недель и значительное увеличение фрагментации.

В случае образцов, хранившихся при 5°C, препарат 6 демонстрировал наилучшие показатели, однако все препараты имели худшие показатели в сравнении с препаратами DS и DP. Во всех препаратах наблюдалось увеличение уровней фрагментации (данные не представлены).

Таблица 7

Условия	Препараты	Временная точка (недели)		
		T04	T08	T12
5°C	1	0,21	0,36	Н/П
	2	0,22	0,18	0,44
	3	0,62	0,59	1,03
	4	0,14	0,06	0,31
	5	0,38	0,38	0,62
	6	0,12	0,16	0,38
	DS	0,20	0,50	0,70
	DP	0,00	0,20	0,40
25°C/60%RH	1	3,88	3,04	Н/П
	2	1,00	0,76	-0,36
	3	1,87	2,23	2,47
	4	1,58	2,56	4,64

	5	1,71	2,09	3,09
	6	1,13	1,39	1,93
	DS	0,80	1,30	1,70
	DP	0,40	0,90	1,30
35°C/75%RH	1	3,44	4,66	Н/П
	2	2,21	2,49	3,29
	3	3,49	3,70	4,59
	4	4,75	6,41	7,82
	5	3,15	4,19	5,11
	6	2,08	3,06	3,19
40°C/75%RH	DP	1,60	2,60	3,80

КЭВ

Капиллярный электрофорез с визуализацией проводили с использованием системы Protein Simple iCE3. Анализы проводили следующим образом:

Препараты 1-6 разбавляли до номинальной концентрации 20 мг/мл, затем до концентрации 2 мг/мл (концентрацию определяли на основании A_{280}) фильтрованной деионизированной водой. Проводили анализ образцов в концентрации 0,2 мг/мл (разведение 1/10 матричной смеси образцов в концентрации 2 мг/мл). Готовили матричную смесь со следующими компонентами (Таблица 8):

Таблица 8

ДИ вода	1% МС	Pharmalytes[®] 3-10	Маркер pI 4,65	Маркер pI 9,50
100 мкл	70 мкл	8 мкл	1 мкл	1 мкл

Параметры фокусировки были следующими: 1 мин при 1500 вольт, затем 6 мин при 3000 вольт.

Результаты приведены в Таблице 9А (% содержание кислых форм) и Таблице 9В (% содержание щелочных форм). При 5°C отсутствовали существенные изменения % содержания кислых форм при всех условиях и во всех препаратах, со всеми значениями, попадающими в диапазон 2-3%.

В случае образцов, хранившихся при 25°C, увеличение % содержания кислых форм можно было наблюдать во всех препаратах через 12 недель, со значительным увеличением в препаратах 1 и 4. Этот результат, по всей вероятности, связан с увеличением рН, наблюдаемым в этих 2 препаратах после начального смешивания.

В случае образцов, хранившихся при 35°C, значительное увеличение % содержания кислых форм наблюдалось после начального смешивания и в последующих временных точках во всех препаратах, при этом в препарате 4 наблюдалось наибольшее увеличение за 12 недель. Стресс, вызываемый замораживанием/размораживанием, не влиял на % содержание кислых форм ни в одном из препаратов.

Что касается % содержания щелочных форм, при 5°C существенные изменения отсутствовали во всех препаратах и во всех временных точках.

В случае образцов, хранившихся при 25°C, в препаратах 3, 5 и 6 имело место небольшое увеличение % содержания щелочных форм с течением времени, при этом в препаратах 1 и 4 наблюдалось более значительное увеличение содержания щелочных форм (примерно 2,5%).

В случае образцов, хранившихся при 35°C, во всех препаратах имело место увеличение % содержания щелочных форм, при этом в препарате 3 наблюдалось наименьшее увеличение. Стресс, вызываемый замораживанием/размораживанием, не влиял на % содержание щелочных форм ни в одном из препаратов.

Таблица 9А

Условия	Временная точка (недели)	Препараты					
		1	2	3	4	5	6
5°C	T начальное	59,80	57,39	57,11	57,72	57,56	56,63
	T04	56,69	58,42	59,06	57,82	60,45	59,30
	T08	60,09	57,26	57,35	58,14	59,81	56,38
	T12	Н/П ^a	59,70	59,37	59,76	59,71	59,02
25°C/60% R H	T начальное	59,80	57,39	57,11	57,72	57,56	56,63
	T04	65,12	61,26	59,99	65,11	60,12	60,46
	T08	68,07	63,38	59,99	69,52	60,05	62,35
	T12	Н/П ^a	55,16	62,37	75,95	Н/П ^b	63,55
35°C/75% R H	T начальное	59,80	57,39	57,11	57,72	57,56	56,63
	T04	68,20	67,65	64,48	69,15	64,39	66,34
	T08	67,79	71,74	67,76	79,29	68,77	71,24
	T12	Н/П ^a	75,11	71,43	87,65	Н/П ^b	83,81
З/Р	T начальное	59,80	57,39	57,11	57,72	57,56	56,63
	T04	57,21	-	-	-	-	-
	T08	-	57,83	58,71	58,02	58,00	57,93
УЗР	T начальное	59,80	57,39	57,11	57,72	57,56	56,63
	T04	58,32	57,41	57,63	57,87	57,55	58,14

a: не доступно

b: не осталось образца для тестирования

Таблица 9В

Условия	Временная точка (недели)	Препараты					
		1	2	3	4	5	6
5°C	T начальное	2,67	2,23	2,34	2,15	2,16	2,28
	T04	2,42	2,53	2,62	2,76	2,83	2,83
	T08	2,97	2,25	2,19	2,70	2,10	2,53
	T12	Н/П ^а	2,77	2,19	2,45	2,41	2,44
35°C/60%RH	T начальное	2,67	2,23	2,34	2,15	2,16	2,28
	T04	3,20	3,28	3,04	3,59	3,27	3,49
	T08	5,24	3,92	2,90	4,34	3,10	2,42
	T12	Н/П ^а	18,61	2,89	4,80	Н/П ^б	2,90
35°C/75%RH	T начальное	2,67	2,23	2,34	2,15	2,16	2,28
	T04	3,64	4,29	3,56	3,64	4,00	4,10
	T08	5,21	4,75	3,53	5,48	4,20	4,14
	T12	Н/П ^а	6,09	3,40	5,02	Н/П ^б	5,13
Медленное З/Р	T начальное	2,67	2,23	2,34	2,15	2,16	2,28
	T04	2,48	-	-	-	-	-
	T08	-	2,51	2,39	3,16	2,26	2,69
Быстрое З/Р	T начальное	2,67	2,23	2,34	2,15	2,16	2,28
	T04	2,37	2,63	2,49	2,28	2,36	2,24

a: не доступно

b: не осталось образца для тестирования

Собственная флуоресценция

Проводили анализ 100-мкл образца из каждого препарата с концентрацией 0,5 мг/мл антитела. Данный способ основан на собственных флуоресцентных свойствах Tgr. Известно, что Tgr имеет сильную флуоресценцию при 340 нм в случае возбуждения при 280 нм и будучи защищен от воды; под воздействием воды Tgr флуоресцирует слабо. Это свойство можно использовать для оценки стабильности белков; когда белок начинает разворачиваться, скрытые остатки Tgr становятся доступными для воды, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции, при агрегации белков больше остатков Tgr становятся скрытыми и интенсивность флуоресценции должна возрастать. Анализ проводили в плоскодонных 96-луночных непрозрачных черных планшетах для измерения флуоресценции, используя планшетный ридер M5 Molecular Devices (считывание сверху, не встряхивать) с длиной волны возбуждения 280 нм и длиной волны излучения от 310 нм до 370 нм, с 6 вспышками на каждое прочтение. Пустой пробой была вода, и эталонным стандартом был 5х эталонный стандарт с концентрацией 0,5 мг/мл. Результаты были нормированы на концентрацию относительно эталонного стандарта и представлены в

5°C	T04	-13,39	87,46	89,36	97,56	99,41	102,29
	T08	-8,17	17,74	34,65	28,22	40,17	20,01
	T12	Н/П ^а	35,38	40,12	48,39	53,86	45,30
25°C/60%R Н	T04	-35,66	58,60	88,02	59,88	88,20	65,40
	T08	-26,35	10,10	27,28	16,17	33,54	18,20
	T12	Н/П ^а	14,55	41,61	31,24	30,22	32,76
35°C/15%R Н	T04	-27,25	93,28	78,42	89,27	93,71	104,94
	T08	-39,64	3,63	33,48	5,05	23,62	1,26
	T12	Н/П ^а	18,58	42,65	17,48	34,17	29,55
ЗР	T04	-17,49	-	-	-	-	-
	T08	-	17,51	35,80	21,76	39,94	22,19
УЗР	T04	-16,59	23,34	37,23	25,37	46,39	26,76

Динамическое рассеяние света

Анализы проводили на аликвотах образцов, разбавленных до концентрации примерно 5 мг/мл в соответствующих фильтрованных буферах без полисорбата 80 или сахарозы (где эти эксципиенты являются частью препарата), на приборе Malvern APS Zetasizer с использованием автодозатора для 96-луночных планшетов. Анализы проводили, как указано в Таблице 11, с углом рассеяния 90° и верхним пределом диапазона размеров 0,5 мкм.

Таблица 11

Параметр	Стандарт размера (60 мкм)	Белковый образец
Материал	латекс	белок
Растворитель	вода	вода
Температура	25°C	25°C
Время установления равновесия	120 сек	120 сек
Скорость отбора образцов	По умолчанию	По умолчанию
Очистка	Интенсивное промывание ^а	Интенсивное промывание ^а
Продолжительность измерений	Автоматическая	Автоматическая
Число измерений	3	5
Увеличенная продолжительность для крупных частиц	-	Да
Множитель времени релаксации	-	1000000
Автоматический выбор ослабления	Да	Да

Обработка данных	Универсальная	Белковый анализ
------------------	---------------	-----------------

а: растворитель для ополаскивания: фильтрованная деионизированная вода;
 промывочный растворитель: 1 М NaOH

Параметрами, учитываемыми при измерениях ДРС, являлись % содержание мономеров и %Пд (полидисперсности) по распределению интенсивности. % содержание мономеров, строго говоря, не отражает содержание мономеров, поскольку ДРС не позволяет дифференцировать молекулы, если они не имеют размер, который по меньшей мере в 6 раз превышает размер мономера. %Пд указывает, является ли распределение мономерным; однако данный метод может не позволять обнаруживать димерные формы. Согласно информации от производителя, распределение с величиной %Пд менее 23% является мономерным, менее 28% является почти мономерным, и более 28% является полидисперсным.

При начальной температуре % содержание мономеров по распределению интенсивности являлось низким (ниже примерно 80%) во всех препаратах (данные не представлены), кроме препарата 1 (выше 90%). На протяжении всего исследования при 5°C значения составляли от примерно 82 до 98% для препаратов 2-6, за исключением препарата 3, для которого наблюдаемые значения составляли примерно 66-68. При 25°C препараты 1, 3 и 4 имели худшие показатели эффективности, с % содержанием мономеров, на основании изменения интенсивности, до значений ниже 80% после T начального в препаратах 1 и 3 и в T04 в препарате 4. При 35°C препараты 1, 3 и 4 имели худшие показатели эффективности, с % содержанием мономеров, на основании изменения интенсивности, до значений $\leq 80\%$ после начальной временной точки. В препарате 5 это изменение произошло после T04.

Что касается %Пд, при 5°C и 25°C отсутствовала какая-либо определенная тенденция для условий и препаратов, со всеми значениями ниже 23%, что означало мономерное распределение. При 35°C, даже при значениях %Пд ниже 23%, наблюдать тенденцию к увеличению можно было во всех препаратах.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия

Проводили анализ ThermoFluor с использованием термостата для быстрой ПЦР в реальном времени Applied BioSystem 7500. Данный метод основан на том факте, что, когда белки подвергают воздействию повышенной температуры, они начинают разворачиваться. Краситель (краситель гасится в водной среде, но не в неполярной среде) добавляют к белку, и по мере разворачивания белка краситель связывается с экспонированными гидрофобными областями и генерирует флуоресцентный сигнал, который обнаруживает детектор термостата для ПЦР. Разные области белка имеют

разную термостабильность, следовательно, будут разворачиваться при разных температурах. Температура, при которой происходит разворачивание, известна как средняя точка тепловой денатурации. Чем выше данная температура, тем выше термостабильность белка в конкретной среде.

Все образцы разбавляли до концентрации 0,12 мг/мл с использованием соответствующего буфера для препарата. Готовили по четыре реплики каждого препарата. Поскольку не был известен эффект полисорбата 20, PEG 3350 и бензилового спирта, производили следующие измерения:

Препарат 1 для измерений разбавляли в буфере для препарата с добавлением, и без добавления, PEG 3350.

Препараты 2 и 4 для измерений разбавляли в буфере для препарата с добавлением, и без добавления, PS20.

Препарат 3 для измерений разбавляли в буфере для препарата с добавлением, и без добавления, бензилового спирта.

Измерения для препаратов 5 и 6 проводили в их соответствующем буфере для препарата.

Готовили раствор красителя путем смешивания 2 мкл 1000X красителя Protein Thermal Shift с 250 мкл деионизированной воды, с получением 8X раствора Protein Thermal Shift.

Образцы готовили для анализа, как указано в Таблице 12А.

Таблица 12А

Компонент	Объем (мкл)
Буфер Protein Thermal Shift	5
Образец с концентрацией 0,12 мг/мл	12,5
8X раствор красителя Protein Thermal Shift	2,5

Образцы готовили в трех повторах в 96-луночном планшете Applied Biosystems MicroAmp Fast Optical и закрывали адгезивной пленкой Applied Biosystems MicroAmp Optical. Для анализа данных использовали программу Protein Thermal Shift. Только Tm2 можно было определять автоматически. Tm1 определяли вручную, используя первую производную термограммы.

Чтобы препараты можно было отличать на основании DSF, разница в Tm должна превышать 2°C (Таблица 12В). Результаты показали, что, по меньшей мере на основании DSF, все препараты были аналогичными.

Таблица 12В

Препараты	Tm1 ^a	Tm2 ^b
1	70-72	74,5
2	70-72	75,0
3	70-72	75,2
4	70-72	74,7
5	70-72	75,2
6	70-72	75,2

a: плечо первой производной; b: основной пик первой производной

Осмоляльность

Анализы проводили на усовершенствованном микроосмометре модели 3320 путем понижения температуры замерзания, используя протокол производителя. Измерения образцов производили в трех повторах. Показатели для препаратов 1 и 6 были ниже 240 мОсм/кг, что является неподходящим для подкожных инъекций (Таблица 13).

Таблица 13

Препарат	Осмоляльность, мОсм/кг
1	168
2	255
3	251
4	408
5	391
6	173

Вязкость

Анализ проводили на 76-мкл аликвотах образцов, используя реометр TA Instruments DHR-1, методом измерения потока в равновесном состоянии. Используемой геометрической формой был 20 мм, 1,99° конус с ловушкой для растворителя, содержащей деионизированную воду, с целью уменьшения испарения материала во время измерения. В методе измерения потока в равновесном состоянии вязкость усредняли для всех точек, в которых было достигнуто равновесное состояние (критерии приемлемости: менее или ровно 5% RSD между точками).

Измерение потока в равновесном состоянии
Температура: 25°C
Время выдержки: 10 сек
Развертка: логарифмическая

Скорость сдвига: 2,9-287,9 с ⁻¹
Точек на декаду: 5
Определение равновесного состояния: да
Максимальное время уравнивания: 180 с
Период выборки: 25 с
% допуска: 5
Последовательно в пределах: 3
Контролируемая скорость: режим двигателя автоматический
Сбор данных: «отображение точки сохранения»
Остановка этапа: нет

Все препараты, кроме препарата 6, были признаны подходящими (Таблица 14).

Таблица 14

Препараты	Вязкость при 25°C, сП (Измерение потока в равновесном состоянии)
1	13,5
2	13,6
3	12,8
4	14,0
5	12,8
6	а

а: не выдержал испытание.

Выводы

ЭХ и ДРС были определены в качестве дифференцирующих анализов.

По результатам ЭХ при 5°C препарат 3 демонстрировал повышенную степень агрегации за 12 недель, хотя значение В22 было аналогичным значению у препаратов 4 и 5. Кроме того, препарат 2, имеющий более высокое значение В22 (3,5), чем препараты 4, 5 и 6 (2,8-2,9), не обеспечивал лучшие показатели, чем препараты 4, 5 и 6, в то время как препарат 6, имеющий отрицательное значение В22, что могло бы быть синонимом белок-белкового сетевого притяжения, приводящего к более высокой склонности к агрегации, имел показатели, аналогичные показателям препаратов 2, 4 и 5.

Учитывая результаты ДРС, в случае хранения при 5°C препарат 6, судя по всему, демонстрировал наилучшие характеристики, а препарат 3 - наихудшие.

Известно, что самоассоциация белков в основном связана с коллоидной

стабильностью, в то время как образование частично развернутых промежуточных форм в основном связано с конформационной стабильностью. Однако эти 2 пути агрегации иногда бывает трудно различать. Часто относительные значения B22 не указывают на тенденцию к агрегации, поскольку сходные значения B22 могут быть получены в разных условиях растворов, независимо от разных тенденций к агрегации, или в условиях, в которых измеренные значения B22 были более отрицательными, наблюдалась меньшая склонность к агрегации (Bajaj, H., Sharma, V.K and Kalonia, D. S., 2004, Biophys. J. 87(6), 4048-4054).

В случае анти-IL-17A/F Ат, приведенных в качестве примера в настоящем документе, скрининговый подход с использованием значений B22 не приводил к результатам, коррелирующим с агрегационным поведением данной молекулы в концентрации 160 мг/мл. Это могло быть следствием того, что механизмы агрегации являются разными при концентрациях 1 мг/мл и 160 мг/мл, или что тенденция к самоассоциации белков не является основной причиной деградации/агрегации данной молекулы.

Кроме того, препараты 1 и 6 имели значения осмоляльности ниже порогового значения 240 мОсм/кг, препараты с осмоляльностью ниже такого значения не являются подходящими для подкожной инъекции; вследствие этого, они не были включены в последующую долгосрочную оценку стабильности. Препарат 3 также был исключен из-за его степени агрегации за 12 недель.

Пример 3: Исследование агрегации 1

Для оценки кинетики образования VM форм анти-IL-17A/F антитело по изобретению было изучено в 2 буферах для препарата:

А: 20 mM гистидин, 250 mM сорбит, pH 6,0 и

В: 55 mM ацетат натрия, 220 mM глицин, pH 5,0

в 4 разных концентрациях антитела (80, 120, 160 и 200 мг/мл) и полисорбата 80 (0,02, 0,03, 0,04 и 0,05%, в зависимости от концентрации антитела) методом ЭХ в многочисленных временных точках на протяжении 3 месяцев при 3 условиях хранения (5°C, 25°C/60%RH и 35°C/75%RH) в отношении образования VM форм.

Анти-IL-17A/F антитело по изобретению находилось в исходном буфере: 20 mM гистидин, 250 mM сорбит, pH 6,0, в концентрации примерно 88 мг/мл, так что замену буфера выполняли только для буфера В без полисорбата 80 с использованием касет Vivaflow 50 с PES мембраной с НОММ 30 кДа. Проводили три цикла с 2 объемами буфера В для препарата.

Антитело в буферах А и В для препарата концентрировали до номинальных

целевых концентраций 120 мг/мл, 160 мг/мл и 200 мг/мл. Значения концентрации, не попадающие в границы 5% от целевого значения, корректировали соответствующим буфером. Концентрации измеряли с использованием SoloVPE (системы Variable Path Extension от C. Technologies, подключенной к спектрофотометру Cary 50) с коэффициентом экстинкции 1,56 при 280 нм.

Все полученные препараты стерилизовали фильтрованием, используя пробирки Steriflip с 0,22-мкм PVDF мембраной, за исключением препарата В в концентрации 200 мг/мл, для которого использовали PES мембрану после засорения PVDF мембраны. Образец в препарате А в концентрации 200 мг/мл было легче фильтровать при использовании PVDF мембранных фильтров, в то время как образец в препарате В в концентрации 200 мг/мл было легче фильтровать при использовании PES мембранных фильтров.

Во все препараты добавляли соответствующее количество полисорбата 80 для получения значений, приведенных в Таблице 15. Процедуру выполняли в ламинарном шкафу.

Таблица 15

Препараты	Концентрация PS80 (% масс/об)
Препараты А и В в концентрации 80 мг/мл	0,02
Препараты А и В в концентрации 120 мг/мл	0,03
Препараты А и В в концентрации 160 мг/мл	0,04
Препараты А и В в концентрации 200 мг/мл	0,05

Три 2-мл флакона с объемом наполнения 1 мл готовили для каждого препарата в каждой концентрации. В каждой временной точке флаконы переносили в ламинарный шкаф и отбирали 2 x 10 мкл аликвоты каждого образца для анализа методом ЭХ, с последующей укупоркой флаконов и помещением их в соответствующие условия хранения. Уменьшение свободного пространства над жидкостью к последней временной точке не повлияло бы на результаты исследования, поскольку общий объем, отобраный из 1 флакона, составлял лишь 260 мкл.

Хранение проводили при 5°C, 25°C/60%RH и 35°C/75%RH с начального момента времени и до 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 18, 28, 42, 56 и 84 дней. Дополнительное измерение через 168 дней проводили только для препарата В в концентрации 160 мг/мл.

Эксклюзионная хроматография

Проводили анализ аликвот образцов, разбавленных до концентрации 5 мг/мл в фильтрованной подвижной фазе (0,2 М Na-фосфат pH 7,0), методом ВЭЖХ на приборе Agilent 1200 серии с использованием автодозатора для 96-луночных планшетов. Анализы проводили следующим образом:

Нагрузка образца: 50 мкл (250 мкг) с концентрацией 5 мг/мл

Колонка: Tosoh BioScience TSK Gel G3000 SWXL, 250 Å, 5 мкм, 7,8x300 мм

Элюент А: 0,2 М фосфат натрия, pH 7,0

Скорость потока: 1 мл/мин

Детекция: УФ (длина волны: 280 нм, разрешение: 8 нм, эталон: выкл.)

Температура колонки: 25°C

Температура образца: 4°C; Градиент: изократический

Максимальное давление: 70 бар; Время прогона: 15 мин; Время перерыва: 5 мин

Анализ данных проводили с использованием программы Empower 2.

Показатели степени агрегации, приведенные в Таблицах 16 и 17, соответствуют среднему ежемесячному увеличению степени для каждого препарата, на основании показателей агрегации, измеренных через 3 месяца или через 6 месяцев, в сравнении с показателями в Т0.

При всех концентрациях препараты В имели лучшие характеристики, с более низкой степенью агрегации с течением времени при 5°C (Таблица 16). Кроме того, через 6 месяцев препарат, содержащий 55 mM Na-ацетат, 220 mM глицин, 0,04% (масс/об) PS80, pH 5,0, с концентрацией анти-IL-17A/F Ат 160 мг/мл, демонстрировал степень агрегации, аналогичную степени у препарата DP или степени у препарата с концентрацией анти-IL-17A/F Ат 80 мг/мл в буфере: 20 mM гистидин, 250 mM сорбит, 0,02% (масс/об) PS80, pH 6,0, через 3 месяца при 5°C (Таблица 16). Отсутствовало значительное увеличение % содержания НМ форм с течением времени при 5°C (данные не представлены).

Таблица 16

Препарат	Концентрация антитела (мг/мл)	Степень через 3 месяца	Степень через 6 месяцев
А	80	0,10	Н/П
В		0,08	Н/П
А	120	0,18	Н/П
В		0,13	Н/П
А	160	0,25	Н/П
В		0,17	0,10

A	200	0,33	Н/П
B		0,21	Н/П
DP	80	0,13	0,10
DS	80	0,23	0,17

При 25°C препараты А и В в каждой концентрации демонстрировали сопоставимую степень агрегации с течением времени (Таблица 17). Однако препарат В проявлял несколько более высокую склонность к фрагментации с течением времени при 25°C, вследствие чего препарат А оказался лучшим препаратом при 25°C во всех концентрациях (данные не представлены). В частности, при 25°C анти-IL17A/F антитело, приведенное в качестве примера в настоящем документе, в буфере: 55 мМ Na-ацетат, 220 мМ глицин, 0,04% (масс/об) PS80, pH 5,0, с концентрацией 160 мг/мл демонстрировало несколько более высокую степень агрегации, чем когда оно было сформулировано в буфере: 20 мМ гистидин, 250 мМ сорбит, 0,02% (масс/об) PS80, pH 6,0, с концентрацией 80 мг/мл (Таблица 17). В сравнении с препаратами DP и DS (полученными в соответствии с примером 2) оба препарата имели более высокую степень агрегации при концентрации 160 мг/мл и 200 мг/мл, хотя при концентрации 80 мг/мл и 120 мг/мл препарат В имел степень агрегации, аналогичную таковой у материала DP и DS.

Таблица 17

Препарат	Концентрация антитела (мг/мл)	Степень через 3 месяца	Степень через 6 месяцев
A	80	0,34	Н/П
B		0,37	Н/П
A	120	0,56	Н/П
B		0,59	Н/П
A	160	0,77	Н/П
B		0,79	0,62
A	200	0,97	Н/П
B		0,97	Н/П
DP	80	0,43	0,30
DS	80	0,57	0,37

При 35°C препараты А во всех концентрациях имели лучшие показатели с течением времени, с более низкой степенью агрегации и фрагментации (в Таблице 18 представлено % содержание ВМ форм). В частности, препарат А в концентрации 160

мг/мл имел такую же степень агрегации, как DP в концентрации 80 мг/мл при 40°C (данные не представлены). DS и DP получали, как описано в примере 2.

Таблица 18

Препарат	концентрация (мг/мл)	Дни													
		0	1	2	3	4	7	10	14	18	28	42	56	84	168
A	80	1,37	1,44	1,47	1,55	1,58	1,68	1,78	1,97	2,08	2,16	2,68	2,88	3,43	Н/П
B		1,17	1,27	1,32	1,40	1,41	1,53	1,69	1,88	2,11	2,21	3,13	3,60	4,75	Н/П
A	120	1,56	1,78	1,87	2,04	2,04	2,3	2,43	2,69	2,90	3,05	3,76	4,05	4,80	Н/П
B		1,36	1,57	1,64	1,77	1,79	2,04	2,23	2,53	2,84	2,95	4,24	4,84	6,36	Н/П
A	160	1,73	2,10	2,27	2,45	2,52	2,84	3,04	3,37	3,61	3,84	4,66	5,01	5,92	Н/П
B		1,49	1,77	1,89	2,03	2,13	2,38	2,64	2,99	3,36	3,49	5,07	5,76	7,53	12,14
A	200	1,97	2,49	2,68	2,95	3,04	3,43	3,65	4,07	4,40	4,69	5,67	6,12	7,24	Н/П
B		1,70	2,10	2,25	2,43	2,53	2,88	3,2	3,66	4,12	4,25	6,47	7,37	9,59	Н/П

Пример 4: Исследование агрегации 2

Поскольку степень агрегации препарата В с концентрацией 160 мг/мл анти-IL-17A/F антитела, как при 5°C, так и при 25°C/60%RH, превышала таковую у материала DS и DP (полученного как описано в примере 2), проводили второе исследование агрегации для подтверждения результатов первого исследования (пример 3) с использованием не состаренного анти-IL-17A/F антитела. Изучали только препарат в буфере: 55 мМ ацетат натрия, 220 мМ глицин, рН 5,0, с 0,02%, 0,03%, 0,04% или 0,05% (масс/об) PS80 (концентрация PS80 в зависимости от концентрации антитела) при 4 разных концентрациях антитела (80 мг/мл, 120 мг/мл, 160 мг/мл и 200 мг/мл) в 3 условиях хранения (5°C, 25°C/60%RH, 35°C/75%RH).

Как и в исследовании агрегации 1, использовали ЭХ для изучения образцов в течение 3 месяцев. Через 3 месяца препарат с концентрацией 160 мг/мл все еще имел хорошие показатели, которые давали основания для проведения оценки долгосрочной стабильности, таким образом, этот препарат также был протестирован через 6 месяцев. Приготовление буферов и флаконов, хранение и методика ЭХ были такими, как описано в примере 3.

Показатели степени агрегации, приведенные в Таблицах 19В, 20В и 21В, соответствуют среднему ежемесячному увеличению степени для каждого препарата, на

основании показателей агрегации, измеренных через 3 месяца или через 6 месяцев, в сравнении с показателями в Т0.

Результаты исследования агрегации 2 подтверждают результаты исследования агрегации 1 при 5°C (Таблица 19А, % содержание ВМ форм и % содержание НМ форм; Таблица 19В, сравнение степеней агрегации в исследованиях 1 и 2), при 25°C/60%RH (Таблица 20А, % содержание ВМ форм и % содержание НМ форм; Таблица 20В, сравнение степеней агрегации в исследованиях 1 и 2) и 35°C/75%RH (Таблица 21А, % содержание ВМ форм и % содержание НМ форм; Таблица 21В, сравнение степеней агрегации в исследованиях 1 и 2).

Таблица 19А

% содержание ВМ форм								
Концентрация (мг/мл)	Дни							
	0	7	14	21	28	56	84	168
80	0,76	0,77	0,79	0,80	0,85	0,87	0,94	1,02
120	0,90	Н/П	0,96	0,96	1,02	1,10	1,18	1,31
160	1,00	1,03	1,08	1,12	1,21	1,28	1,41	1,58
200	1,09	1,14	1,22	1,25	1,32	1,48	1,60	1,78
% содержание НМ форм								
Концентрация (мг/мл)	Дни							
	0	7	14	21	28	56	84	168
80	0,65	0,68	0,69	0,75	0,66	0,69	0,72	0,78
120	0,59	Н/П	0,64	0,66	0,64	0,69	0,73	0,79
160	0,62	0,69	0,73	0,70	0,63	0,70	0,74	0,77
200	0,58	0,70	0,69	0,72	0,68	0,67	0,74	0,82

Таблица 19В

Исследование агрегации	Концентрация антитела (мг/мл)	Степень через 3 месяца	Степень через 6 месяцев
1	80	0,08	Н/П

2		0,06	0,04
1	120	0,13	Н/П
2		0,09	0,07
1	160	0,17	0,10
2		0,14	0,10
1	200	0,21	Н/П
2		0,17	0,12
DP	80	0,13	0,10
DS	80	0,23	0,17

Таблица 20А

% содержание ВМ форм								
Концентрация (мг/мл)	Дни							
	0	7	14	21	28	56	84	168
80	0,76	0,88	0,99	1,05	1,16	1,41	1,69	2,30
120	0,90	1,12	1,29	1,38	1,51	1,92	2,28	3,10
160	1,00	1,34	1,61	1,77	1,96	2,51	2,96	4,05
200	1,09	1,54	1,85	2,00	2,20	2,82	3,32	4,53
% содержание НМ форм								
Концентрация (мг/мл)	Дни							
	0	7	14	21	28	56	84	168
80	0,65	0,78	0,90	0,99	1,04	1,39	1,88	2,54
120	0,59	0,77	0,84	0,98	0,96	1,32	1,82	2,46
160	0,62	0,77	0,81	0,94	0,98	1,37	1,79	2,54
200	0,58	0,78	0,89	0,95	0,99	1,36	1,80	2,31

Таблица 20В

Исследование агрегации	Концентрация антитела (мг/мл)	Степень через 3 месяца	Степень через 6 месяцев
-----------------------------------	--	-----------------------------------	------------------------------------

1	80	0,37	Н/П
2		0,31	0,26
1	120	0,59	Н/П
2		0,46	0,37
1	160	0,79	0,62
2		0,65	0,51
1	200	0,97	Н/П
2		0,74	0,57
DP	80	0,43	0,30
DS	80	0,57	0,37

Результаты, приведенные в Таблицах 19В, 20В и 21В, показывают, что в исследовании агрегации 2 (проведенном со свежим материалом антитела) степень агрегации и фрагментации была немного ниже, чем в исследовании агрегации 1.

Таблица 21А

% содержание ВМ форм								
Концентрация (мг/мл)	Дни							
	0	7	14	21	28	56	84	168
80	0,76	1,14	1,45	1,66	1,91	2,85	3,85	6,60
120	0,90	1,45	1,93	2,21	2,54	3,80	4,95	8,15
160	1,00	1,85	2,45	2,83	3,23	4,71	6,11	9,91
200	1,09	2,10	2,77	3,17	3,64	5,24	6,74	10,81
% содержание НМ форм								
Концентрация (мг/мл)	Дни							
	0	7	14	21	28	56	84	168
80	0,65	0,98	1,34	1,62	1,82	2,99	4,08	6,66
120	0,59	0,98	1,35	1,58	1,78	2,94	4,05	6,41
160	0,62	0,94	1,32	1,60	1,74	2,85	3,87	6,21
200	0,58	0,96	1,30	1,86	1,74	2,80	3,78	5,95

Таблица 21В

Исследование агрегации	Концентрация антитела (мг/мл)	Степень через 3 месяца	Степень через 6 месяцев
1	80	1,19	Н/П
2		1,03	0,97
1	120	1,67	Н/П
2		1,35	1,21
1	160	2,01	1,78
2		1,70	1,49
1	200	2,63	Н/П
2		1,88	1,62
DP	80	1,27 ^a	1,02 ^a
DS	80	1,19	Н/П

a: при 40°C/75% RH

Пример 5: Исследование долгосрочной стабильности

С учетом результатов исследований агрегации (примеры 3 и 4) и дополнительного скринингового исследования при концентрации 160 мг/мл (пример 2) следующие препараты были выбраны для оценки долгосрочной стабильности (Таблица 22). Все препараты содержали 160 мг/мл анти-IL-17A/F Ат, приведенного в качестве примера в настоящем документе, и также были подвергнуты 5 циклам замораживания/размораживания.

Таблица 22

A	40 мМ цитрат натрия, 50 мМ K ₂ HPO ₄ , 75 мМ сахараза, 0,00044% (масс/об) PS20, pH 5,6	Препарат 2, примеры 1 и 2
B	40 мМ цитрат натрия, 25 мМ K ₂ HPO ₄ , 100 мМ сахараза, 0,00022% (масс/об) PS20, pH 5,5	Препарат 4, примеры 1 и 2
C	40 мМ ацетат натрия, 25 мМ K ₂ HPO ₄ , 125 мМ сахараза, pH 5,7	Препарат 5, примеры 1 и 2
D	55 мМ ацетат натрия, 220 мМ глицин, 0,04% (масс/об) PS80, pH 5,0	Препарат В, примеры 3 и 4
E	20 мМ гистидин, 250 мМ сорбит, 0,04% PS80, pH 6,0	Препарат А, примеры 3 и 4

При формулировании препарата цикл замены буфера для препаратов А, В и С занимал больше времени, чем для препарата Е (~90 минут для препаратов А-С и 50 минут

для препарата Е). Препараты А и В проявляли себя аналогично, и в процессе этапов замены буфера и концентрирования оба препарата были мутными. Кроме того, смыв в случае каждого из этих препаратов был мутным и имел молочный цвет. Препарат С также был мутным в процессе этапов замены буфера и концентрирования. В случае препаратов D и E заметные различия отсутствовали, хотя казалось, что препарат Е лучше проявляет себя при концентрировании и фильтровании в сравнении с другими препаратами. Показатели осмоляльности (измерения при помощи мульти-осмометра 2430 от Precision System), вязкости (измерения при помощи автоматического мульти-вискозиметра Anton Paar), pH (Mettler Toledo SevenMulti), внешнего вида, поглощения при 280 нм (спектрофотометр Agilent 8453), SDS-ПААГ, кИЭФ (измерения при помощи системы Protein Simple iCE280, смотри пример 2), активности связывания (измерения при помощи системы GE Healthcare Biacore T100), анализа невидимых глазом частиц методом затенения (система НИАС 9703 от компании Nach Lange), КО-ВЭЖХ и ЭХ-ВЭЖХ определяли на протяжении 6 месяцев (вязкость и осмоляльность измеряли только во временной точке 0) во временных точках 0, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 6 месяцев. Если не указано конкретно, использовали методы, описанные в примере 2. После временной точки шесть месяцев оценивали только образцы препарата D. Для всех препаратов использовали объем образца 1,0 мл. Для исследования с замораживанием/размораживанием все препараты хранили при -70°C в течение ≥ 12 часов, затем хранили при комнатной температуре до полного размораживания (≥ 2 часов). Процедуру повторяли для в общей сложности 5 циклов замораживания/размораживания.

Вязкость

Вязкость измеряли с использованием автоматического мульти-вискозиметра Anton Paar. Показатели вязкости препаратов А-Е определяли в момент времени ноль. Все препараты имели показатели вязкости в диапазоне 2,3–17,3 сП. Образцы оценивали при комнатной температуре (примерно $25,00 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$).

Осмоляльность

Осмоляльность определяли с использованием мульти-осмометра 2430 от Precision Systems. Образцы не разбавляли. Осмоляльность тестировали в момент времени ноль для всех препаратов. Показатели осмоляльности находились в диапазоне от 316 мОсм/кг до 450 мОсм/кг.

pH

pH измеряли при 25°C с использованием pH-метра Mettler Toledo sevenMulti. Образцы не разбавляли. pH определяли для каждого препарата в каждой точке данных. В течение первых 6 месяцев определения стабильности значение pH препаратов А и В в

каждой временной точке составляло $5,5 \pm 0,1$, значение рН препарата С составляло $5,7 \pm 0,1$, и значение рН препарата Е составляло $6,2 \pm 0,2$. В течение 12-месячного изучения стабильности значение рН препарата D составляло 5,1. Никакого изменения значения рН в сравнении с моментом времени ноль не наблюдали ни в одном из пяти препаратов, оцениваемых в исследовании с замораживанием/размораживанием.

Внешний вид

В каждой временной точке в течение 12 месяцев изучения стабильности, включая замораживание/размораживание, оценивали внешний вид каждого препарата. Все препараты в течение первых 6 месяцев изучения стабильности имели внешний вид, соответствующий описанию «желто-коричневый прозрачный раствор без видимых частиц». После временной точки 4 месяца внешний вид был определен как «прозрачная желтая жидкость без видимых частиц». Наблюдаемое изменение внешнего вида всех препаратов можно объяснить тем, что оценка произведена разными аналитиками. Вследствие этого, отсутствовали различия между препаратами в течение 12-месячного изучения стабильности.

Поглощение при 280 нм

Концентрации белка определяли с использованием спектрофотометра Agilent 8453. Образцы разбавляли гравиметрически до концентрации 0,5 мг/мл в их соответствующих буферах. Перед анализом каждого препарата в систему добавляли пустую пробу, содержащую буфер для препарата. Отсутствовали четкие тенденции в исследовании с замораживанием/размораживанием или на протяжении 12-месячного исследования стабильности, свидетельствуя о том, что любые наблюдаемые изменения концентрации объяснялись вариабельностью анализов. Не наблюдали какого-либо постоянного уменьшения концентрации ни в одном из 5 препаратов.

SDS-ПААГ

Анализ методом SDS-ПААГ проводили с использованием 4-20% геля в трис-глициновом буфере с нагрузкой 3 мкг (не восстанавливающие условия с IAA) или 4 мкг (восстанавливающие условия с DTT) на каждую дорожку. Денатурацию проводили, инкубируя образцы при 70°C в течение 5 мин. Для окрашивания использовали краситель коллоидный синий.

Анализ образцов для исследования стабильности методом SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях показал отсутствие тенденции к изменению (увеличению или уменьшению) % содержания тяжелых цепей (HC) и легких цепей (LC) в каком-либо из препаратов, за исключением измерений, произведенных для условий ускоренного старения и стресса. Уменьшение % содержания HC + LC наблюдали во всех препаратах в

условиях 25°C/60%RH, с еще большим уменьшением, наблюдаемым в препаратах в условиях 40°C/75%RH. В каждом из препаратов в этих условиях наблюдали образование новых форм. Изменения отсутствовали во всех препаратах, оцениваемых в исследовании с замораживанием/размораживанием.

Анализ образцов для исследования стабильности методом SDS-ПААГ в не восстанавливающих условиях показал общее уменьшение % содержания IgG во всех препаратах и при всех условиях. Наибольшее уменьшение % содержания IgG наблюдали в препаратах, хранившихся при 25°C/60%RH и 40°C/75%RH. Образование агрегированных форм было особенно заметным в препарате D в условиях 40°C/75%RH. Изменения отсутствовали во всех препаратах, оцениваемых в исследовании с замораживанием/размораживанием.

КИЭФ

Площадь, %, основного пика в препаратах, хранившихся при -70°C и 2-8°C, изменялась незначительно, или не изменялась, в течение 12 месяцев исследования стабильности. Наблюдали уменьшение площади, %, основного пика для всех препаратов, хранившихся в условиях 25°C/60%RH, с еще большим уменьшением, наблюдаемым для препаратов, хранившихся в условиях 40°C/75%RH. Это уменьшение было немного выше в препарате D, и немного ниже в препарате E.

Во всех препаратах отсутствовало изменение % содержания кислых форм при -70°C и 2-8°C. Наблюдали увеличение % содержания кислых форм в препаратах, хранившихся при 25°C/60%RH и 40°C/75%RH. В препарате D имело место немного большее увеличение % содержания кислых форм в условиях 25°C/60%RH. В условиях 40°C/75%RH в препаратах B и D наблюдали несколько большее увеличение % содержания кислых форм, а в препарате E наблюдали несколько меньшее увеличение.

Отсутствовало какое-либо значительное изменение % содержания щелочных форм в препаратах, хранившихся при -70°C и 2-8°C. Небольшое увеличение наблюдали в препаратах, хранившихся в условиях 25°C/60%RH, с еще большим увеличением % содержания щелочных форм в препарате A при хранении в условиях 40°C/75%RH. Во временной точке 2 месяца произошла потеря разрешения из-за проблем с капиллярами, что вызвало уменьшение % содержания щелочных форм во всех препаратах и при всех условиях. Во всех временных точках наблюдали большую вариабельность % содержания щелочных форм.

Отсутствовали изменения содержания кислых, основных или щелочных форм в препаратах A-E при замораживании/размораживании.

Biacore

Связывание IL-17A и IL-17F измеряли с использованием Biacore T100 (GE Healthcare). Все эксперименты проводили при 25°C. Affinipure F(ab')₂-фрагмент антител козы против IgG человека, специфический для Fc-фрагмента (Jackson ImmunoResearch, категория № 109-006-098, лот № 83295) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (Biacore AB, категория № BR1000-14, использовали разные чипы из лота № 10030608) за счет химической реакции связывания через аминокислотные группы для захвата примерно 7000 единиц ответа (EO). Буфер HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% сурфактант P20, GE Healthcare) использовали в качестве подвижного буфера, со скоростью потока 10 мкл/мин. Для захвата использовали инъекцию 10 мкл каждого образца антитела в концентрации 0,5 мкг/мл. Рекомбинантный человеческий IL-17A (R&D Systems, каталожный номер 317-ILB) и IL-17F (R&D Systems, каталожный номер 1335-IL) титровали над захваченным анти-IL17AF антителом в двукратных разведениях от 10 нМ до 2,5 нМ, и от 10 нМ до 1,25 нМ, соответственно, со скоростью потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали со скоростью потока 10 мкл/мин путем инъекции 10 мкл 40 mM HCl, с последующей инъекцией 5 мкл 5 mM NaOH.

Построенные с вычитанием двойного эталонного фона кривые связывания анализировали с использованием программы BIAevaluation (версия 3.2) в соответствии со стандартной процедурой. Кинетические параметры определяли на основании алгоритма подбора (Biacore, модель Ленгмюра для связывания 1:1).

Отсутствовали какие-либо тенденции в активности связывания на протяжении первых 12 месяцев исследования стабильности, это указывало на то, что изменения K_D были в пределах вариабельности анализа. Была проведена оценка образцов, подвергнутых замораживанию/размораживанию, параллельно с образцами через 1 месяц в исследовании стабильности. Изменения в этих образцах отсутствовали, и незначительные изменения K_D находились в пределах вариабельности метода.

Эксклюзионная хроматография

ЭХ проводили на аликвотах образцов, разбавленных до концентрации 1 мг/мл фильтрованным элюентом А, с использованием системы Agilent 1200 серии со следующими параметрами:

- Нагрузка образца: 20 мкл (20 мкг) с концентрацией 1 мг/мл
- Колонка: Tosoh BioScience TSK Gel G3000 SWXL, 250 Å, 5 мкм, 7,8x300 мм (номер партии: 8541)
- Элюент А: 0,05 M Na₂HPO₄, 0,25 M NaCl pH 7,2
- Скорость потока: 0,5 мл/мин
- Детекция: УФ (длина волны: 280 нм, разрешение: 8 нм, эталон: выкл.)

- Температура колонки: $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Температура образца: $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Градиент: изократический
- Максимальное давление: 70 бар
- Время прогона: 35 мин

Во всех препаратах отсутствовали изменения площади, %, основного пика при -70°C , и небольшое изменение наблюдалось при $2-8^{\circ}\text{C}$. Уменьшение площади, %, основного пика наблюдалось во всех препаратах, хранившихся в условиях $25^{\circ}\text{C}/60\%RH$, и еще большее уменьшение – в препаратах, хранившихся в условиях $40^{\circ}\text{C}/75\%RH$. В целом, в препарате D наблюдали максимальное уменьшение площади, %, основного пика в течение 6 месяцев исследования стабильности в условиях $25^{\circ}\text{C}/60\%RH$ и 3 месяцев исследования стабильности в условиях $40^{\circ}\text{C}/75\%RH$.

Отсутствовали существенные изменения % содержания ВМ и % содержания НМ форм во всех препаратах, хранившихся при -70°C . Имело место небольшое увеличение % содержания ВМ, но отсутствовало какое-либо заметное изменение % содержания НМ в препаратах, хранившихся при $2-8^{\circ}\text{C}$. На протяжении шести месяцев исследования стабильности степень агрегации была ниже в препаратах А, В и D в сравнении с препаратами С и Е. В условиях $25^{\circ}\text{C}/60\%RH$ и $40^{\circ}\text{C}/75\%RH$ наблюдали увеличение содержания как ВМ, так и НМ, форм. В препарате D наблюдали наибольшее увеличение содержания как ВМ, так и НМ, форм на протяжении 6 месяцев исследования стабильности в условиях $25^{\circ}\text{C}/60\%RH$, и более 3 месяцев исследования стабильности в условиях $40^{\circ}\text{C}/75\%RH$.

Изменения отсутствовали во всех препаратах, оцениваемых в исследовании с замораживанием/размораживанием.

Катионообменная хроматография

КОХ проводили на аликвотах образцов, разбавленных до концентрации 1 мг/мл элюентом А, с использованием системы Agilent 1100 со следующими параметрами:

Нагрузка образца: 20 мкл (20 мкг)

Колонка: BioMAb, NP5, PK, 4,6 * 250 мм # Agilent 5190-2407

Элюент А: 10 mM фосфат натрия, pH 6,0

Элюент В: 10 mM фосфат натрия, 1 M NaCl, pH 6,0

Скорость потока: 1 мл/мин

Длина волны: 220 нм ширина полосы 8 нм/220 нм ширина полосы 8 нм, эталон 360 нм ширина полосы 100, щель 4 нм

Ширина пика: 0,1 мин (2 с)

Температура колонки: 25°C

Температура образца: 4°C

Градиент:

Время (мин)	%В
0	2
40	15
40,02	100
45	100
45,02	2
60	2

Во всех препаратах и при всех условиях на протяжении 12 месяцев исследования стабильности отсутствовали изменения площади, %, основного пика в условиях -70°C или 2-8°C. Наблюдали уменьшение в условиях 25°C/60%RH, и еще большее уменьшение в стрессовых условиях 40°C/75%RH. В условиях 25°C/60%RH все препараты имели аналогичные показатели в пределах вариабельности анализа. В условиях 40°C/75%RH препараты А, В, С и D имели аналогичные показатели с препаратом Е, демонстрируя меньшее уменьшение.

Площадь, %, для кислых и щелочных форм не изменялась на протяжении 12 месяцев исследования в препаратах, хранившихся при -70°C и 2-8°C. Однако уменьшение площади, %, основного пика в препаратах, хранившихся в условиях 25°C/60%RH и 40°C/75%RH, соответствовало, в основном, увеличению площади, %, для кислых форм, с меньшим увеличением, наблюдаемым в случае площади, %, для щелочных видов. Все препараты имели аналогичные показатели в пределах вариабельности анализа. Метод КОХ имеет высокую вариабельность – 5% для кислых форм и 9% для щелочных форм.

Отсутствовали изменения площади, %, пиков для основных, кислых или щелочных форм в образцах, подвергнутых стрессу путем замораживания/размораживания.

НИАС

Анализ невидимых глазом частиц методом затенения проводили с использованием системы НАСН Lange НИАС9703, разбавляя 200 мкл образца в 1000 мкл WFI. Два отобранных 500-мкл образца анализировали на частицы размером $\geq 2, 5, 10$ и 25 мкм, данные для второго отбора образца корректировали на разведение (результаты умножали на 5) и представляли в размерности частиц/мл.

Результаты были достаточно постоянными в течение 12 месяцев, с различиями, возникающими вследствие вариабельности анализа. Изменения отсутствовали в образцах, подвергнутых стрессу путем замораживания/размораживания.

Выводы

В случае хранения образцов при 2-8°C лишь результаты ЭХ демонстрировали какие-либо различия между препаратами. Все препараты имели аналогичные низкие уровни фрагментации, однако в препаратах А, В и D наблюдалась наименьшая степень агрегации на протяжении исследования, при этом D отличался самым низким исходным уровнем ВМ форм. Результаты ЭХ, в сочетании с результатами обработки, привели к заключению, что, если препарат предстоит хранить при 5°C, и не в условиях, аналогичных тем, которые используют в исследованиях ускоренного старения препаратов или влияния стресса, препарат D имеет наилучшие показатели при 2-8°C, затем следует препарат Е, также в свете того факта, что препарат D с концентрацией анти-IL-17A/F Ат 160 мг/мл имел профиль, сопоставимый с профилем DP в концентрации 80 мг/мл, и меньше проблем при обработке.

Пример 6: 3-месячное скрининговое исследование устойчивости препаратов, проведенное с избранными препаратами

Был разработан дизайн эксперимента (DoE) на основании плана дробного факторного эксперимента с 3 центральными точками с использованием статистической программы JMP версии 11 от SAS. Задача заключалась в первичном скрининге следующих переменных в препаратах путем тестирования основных эффектов и взаимодействий в течение 12 недель при 2 условиях: $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{RH}$:

- концентрация ацетата ($55 \text{ мМ} \pm 20\%$)
- концентрация глицина ($220 \text{ мМ} \pm 20\%$)
- концентрация полисорбата 80 ($0,04\% \pm 0,02\%$)
- pH ($4,9 \pm 0,3$)
- концентрация белка ($160 \pm 15\%$).

Были получены препараты, содержащие анти-IL17A/F антитело, приведенное в качестве примера в настоящем документе, которые подробно представлены в Таблице 23. Препарат 20 был добавлен для оценки влияния на стабильность при низких концентрациях белка и эксципиентов. Препараты готовили путем замены буфера для анти-IL17A/F антитела, приведенного в качестве примера в настоящем документе, находящегося в концентрации 50 мг/мл в соответствующем препарате, приведенном в Таблице 23, без PS80. Было проведено семь циклов, прежде чем концентрация белка была доведена до целевой концентрации, указанной в Таблице 23. Препарат 20 готовили путем разведения препарата 9. 10% маточный раствор PS80 использовали для добавления в каждый препарат до достижения целевой концентрации PS80, указанной в Таблице 23.

Таблица 23

Препараты	Целевая концентрация	Измеренная концентрация	Ацетат (мМ)	Глицин (мМ)	Полисорбат 80 (масс/об)	Осмоляльность	рН буфера для ДФ	Измеренное значение рН	Смещение рН
F1	160	160,0	55	220	0,04	350	4,90	5,02	0,12
F2	136	138,2	66	264	0,02	405	5,21	5,28	0,07
F3	136	135,8	66	176	0,02	291	4,60	4,75	0,15
F4	136	134,8	44	176	0,06	262	4,60	4,80	0,21
F5	184	186,4	44	176	0,06	310	5,20	5,35	0,15
F6	184	188,1	66	264	0,02	432	4,60	4,81	0,21
F7	136	135,1	44	264	0,06	363	5,21	5,31	0,10
F8	136	134,8	66	264	0,06	377	4,61	4,76	0,15
F9	136	134,4	44	176	0,02	277	5,20	5,31	0,10
F10	184	190,3	44	264	0,06	398	4,60	4,90	0,30
F11	136	137,0	44	264	0,02	354	4,61	4,84	0,23
F12	184	184,5	44	176	0,02	293	4,60	4,88	0,28
F13	184	185,8	44	264	0,02	402	5,20	5,35	0,15
F14	184	187,1	66	264	0,06	442	5,21	5,30	0,08
F15	160	161,9	55	220	0,04	349	4,90	5,05	0,15
F16	160	160,3	55	220	0,04	344	4,90	5,04	0,14
F17	136	137,2	66	176	0,06	311	5,18	5,25	0,07
F18	184	184,5	66	176	0,06	326	4,60	4,81	0,21
F19	184	184,3	66	176	0,02	355	5,20	5,31	0,11
F20	68	69,9	44	176	0,02	262	5,20	5,26	0,06

После стерилизации фильтрованием 1 мл каждого препарата переносили в 2-мл стеклянные флаконы Schott Type I[®], закупоренные покрытыми Flurotec резиновыми пробками Westar, и герметизировали Tru-Edge[®] Flip-off[®] для начального тестирования и хранения при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%\text{RH}$.

Значения рН и осмоляльности, приведенные в Таблице 23, измеряли в момент времени T начальное, при этом визуальную оценку, а также ЭХ и КЭВ проводили во временных точках 4, 8 и 12 недель (T12w). ЭХ проводили на аликвотах образцов, разбавленных до концентрации 1 мг/мл фильтрованным элюентом А (0,05 М Na₂HPO₄, 0,25 М NaCl рН 7,2), с использованием системы Agilent 1200 серии со следующими

параметрами:

- Нагрузка образца: 20 мкл (20 мкг) с концентрацией 1 мг/мл
- Колонка: Tosoh BioScience TSK Gel G3000 SWXL, 250 Å, 5 мкм, 7,8x300 мм

(номер партии: 8541)

- Скорость потока: 0,5 мл/мин
- Детекция: УФ (длина волны: 280 нм, разрешение: 8 нм, эталон: выкл.)
- Температура колонки: 20 ± 5°C
- Температура образца: 6 ± 2°C
- Градиент: изократический
- Максимальное давление: 70 бар
- Время прогона: 35 мин

Анализ данных проводили с использованием программы Empower 3.

При анализе всех препаратов отсутствовали существенные изменения в % содержании НМ форм во всех препаратах, хранившихся при 5°C, но при этом имело место увеличение во всех препаратах, хранившихся при 25°C. Как и ожидалось, некоторое увеличение % содержания ВМ форм в течение 12 недель наблюдалось во всех препаратах, при этом в препаратах, хранившихся при 25°C, имело место более выраженное увеличение, чем в препаратах, хранившихся при 5°C (Таблица 24).

Таблица 24

Препараты	T12w ЭХ % ВМ	Дельта за 3 М	T12w ЭХ % Моно	Дельта за 3 М	T12w ЭХ % НМ	Дельта за 3 М
5°C						
F1	2,39	0,65	96,53	-0,76	1,08	0,11
F2	2,38	0,65	96,57	-0,75	1,05	0,10
F3	2,06	0,55	96,86	-0,66	1,08	0,12
F4	2,02	0,50	96,90	-0,61	1,09	0,11
F5	2,88	0,81	96,06	-0,91	1,06	0,09
F6	2,41	0,71	96,50	-0,83	1,09	0,12
F7	2,38	0,65	96,54	-0,79	1,08	0,14
F8	1,99	0,49	96,93	-0,58	1,08	0,09
F9	2,42	0,66	96,52	-0,76	1,06	0,10
F10	2,50	0,73	96,43	-0,82	1,06	0,09
F11	1,99	0,50	96,92	-0,61	1,08	0,10

F12	2,47	0,72	96,46	-0,82	1,07	0,09
F13	2,78	0,86	96,18	-0,93	1,05	0,08
F14	2,87	0,86	96,07	-0,94	1,06	0,08
F15	2,30	0,60	96,64	-0,69	1,06	0,09
F16	2,37	0,65	96,57	-0,74	1,05	0,08
F17	2,41	0,65	96,53	-0,74	1,06	0,09
F18	2,44	0,69	96,47	-0,79	1,09	0,10
F19	2,93	0,90	96,01	-0,99	1,06	0,09
F20	1,85	0,39	97,07	-0,51	1,08	0,12
25°C						
F1	4,21	2,47	93,56	-3,73	2,23	1,26
F2	4,43	2,70	93,60	-3,72	1,97	1,02
F3	3,45	1,94	93,89	-3,63	2,66	1,70
F4	3,38	1,86	94,13	-3,38	2,49	1,51
F5	5,11	3,04	93,00	-3,97	1,88	0,91
F6	4,56	2,86	92,81	-4,52	2,63	1,66
F7	4,30	2,57	93,73	-3,60	1,97	1,03
F8	3,54	2,04	93,80	-3,71	2,66	1,67
F9	4,15	2,39	93,90	-3,38	1,95	0,99
F10	4,68	2,91	92,91	-4,34	2,41	1,44
F11	3,50	2,01	94,01	-3,52	2,48	1,50
F12	4,44	2,69	93,21	-4,07	2,35	1,37
F13	5,43	3,51	92,67	-4,44	1,91	0,94
F14	5,43	3,42	92,65	-4,36	1,92	0,94
F15	4,23	2,53	93,59	-3,74	2,18	1,21
F16	4,39	2,67	93,44	-3,87	2,17	1,20
F17	4,12	2,36	93,90	-3,37	1,99	1,02
F18	4,43	2,68	93,02	-4,24	2,55	1,56
F19	5,30	3,27	92,78	-4,22	1,92	0,95
F20	4,21	2,47	93,56	-3,73	2,23	1,26

Капиллярный электрофорез с визуализацией проводили с использованием системы Protein Simple iCE3. Анализы проводили следующим образом:

Образцы разбавляли до номинальной концентрации 20 мг/мл, затем до

концентрации 2 мг/мл фильтрованной деионизированной водой. Анализы проводили на образцах с концентрацией 0,2 мг/мл (разведение 1/10 матричной смеси образцов с концентрацией 2 мг/мл). Готовили матричную смесь со следующими компонентами (Таблица 25).

Таблица 25

1% МС	Pharmalytes[®] 3-10	Маркер рI 4,65	Маркер рI 9,50	4 М Мочевина
70 мкл	8 мкл	1 мкл	1 мкл	100 мкл

Параметры фокусировки были следующими: 1 мин при 1500 вольт, затем 6 мин при 3000 вольт.

Как показано в Таблице 26, во всех препаратах отсутствовали существенные изменения % содержания кислых и щелочных форм в случае препаратов, хранившихся при 5°C. Что касается % содержания ВМ форм, в препаратах, хранившихся при 25°C, наблюдалось более выраженное увеличение % содержания кислых и щелочных форм, чем в препаратах, хранившихся при 5°C (Таблица 26).

Таблица 26

Препараты	КЭВ, % кислых форм	Дельта за 3 М	КЭВ, % основных форм	Дельта за 3 М	КЭВ, % щелочных форм	Дельта за 3 М
5°C						
F1	50,3	0,8	45,4	-1,0	4,2	0,2
F2	50,4	0,8	45,6	-0,3	4,0	-0,5
F3	49,8	0,4	46,1	-0,2	4,1	-0,2
F4	49,9	-0,2	45,8	0,7	4,2	-0,5
F5	50,5	0,2	45,5	-0,6	4,1	0,4
F6	50,2	0,3	45,7	-0,2	4,1	-0,1
F7	50,3	0,1	45,7	0,1	4,1	-0,3
F8	49,6	-0,4	45,9	0,5	4,4	-0,1
F9	50,2	0,9	46,0	-0,5	3,9	-0,4
F10	50,5	0,4	45,1	-0,7	4,4	0,3
F11	50,4	0,5	45,5	-0,6	4,2	0,1
F12	50,4	1,4	45,3	-1,4	4,3	0,0
F13	50,2	1,3	45,6	-1,1	4,2	-0,2

F14	50,5	0,6	45,3	-0,5	4,2	-0,1
F15	50,0	0,3	45,6	-0,5	4,4	0,2
F16	50,3	1,2	45,7	-1,0	4,1	-0,2
F17	50,0	1,2	46,1	-0,9	4,0	-0,3
F18	49,8	-0,3	46,0	0,2	4,2	0,2
F19	50,5	0,6	45,4	-0,3	4,2	-0,3
F20	49,9	-0,8	45,9	0,8	4,2	0,0
25°C						
F1	55,34	5,79	39,4	-7,0	5,3	1,2
F2	55,99	6,39	39,3	-6,6	4,7	0,2
F3	54,13	4,75	39,9	-6,3	5,9	1,6
F4	54,99	4,88	39,3	-5,8	5,7	1,0
F5	55,75	5,50	39,7	-6,4	4,6	0,9
F6	54,90	5,01	39,2	-6,8	5,9	1,8
F7	56,50	6,39	38,6	-6,9	4,9	0,5
F8	55,21	5,13	38,9	-6,5	5,9	1,4
F9	55,53	6,23	39,6	-6,9	4,9	0,6
F10	55,34	5,24	39,1	-6,7	5,6	1,5
F11	55,33	5,52	38,9	-7,2	5,8	1,7
F12	54,66	5,73	39,3	-7,4	6,0	1,7
F13	56,05	7,14	39,5	-7,3	4,5	0,1
F14	56,08	6,17	39,2	-6,6	4,7	0,4
F15	55,11	5,37	39,6	-6,5	5,3	1,1
F16	54,66	5,54	40,0	-6,7	5,3	1,1
F17	55,30	6,50	39,8	-7,2	5,0	0,7
F18	54,20	4,10	39,6	-6,2	6,2	2,1
F19	55,09	5,20	39,6	-6,1	5,3	0,9
F20	54,89	4,27	40,2	-4,9	4,9	0,6

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:

a. от примерно 80 мг/мл до примерно 200 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2;

b. ацетат;

c. глицин;

d. полисорбат 80 и;

имеющая значение pH от примерно 4,6 до примерно 5,5.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая от примерно 120 мг/мл до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно примерно 160 мг/мл.

3. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая от примерно 0,01% до примерно 0,07% (масс/об) полисорбата 80.

4. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина.

5. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, предпочтительно от примерно 40 мМ до примерно 90 мМ ацетата.

6. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, при этом антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывает человеческий IL-17A и человеческий IL17F.

7. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая:

a. от примерно 120 мг/мл до примерно 185 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента;

b. от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, предпочтительно от примерно 40 мМ до примерно 90 мМ ацетата;

c. от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина;

d. от примерно 0,01% до примерно 0,07% (масс/об) полисорбата 80,

при этом композиция имеет значение pH от примерно 4,6 до примерно 5,5.

8. Способ получения фармацевтической композиции, включающий этапы:

а. получения низкоконцентрированного препарата путем объединения от примерно 40 мг/мл до примерно 50 мг/мл антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, с буферным раствором, содержащим глицин и ацетат при pH от примерно 4,6 до примерно 5,5;

б. получения высококонцентрированного препарата путем концентрирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в низкоконцентрированном препарате, полученном на этапе а), до концентрации от примерно 160 мг/мл до примерно 180 мг/мл;

с. добавления к высококонцентрированному препарату, полученному на этапе б), полисорбата 80;

д. необязательно, перед этапом с) корректировки концентрации антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, буферным раствором, содержащим глицин и ацетат.

9. Способ по п. 8, при этом буферный раствор содержит от примерно 20 мМ до примерно 100 мМ ацетата, предпочтительно от примерно 40 мМ до примерно 90 мМ ацетата, и от примерно 140 мМ до примерно 350 мМ глицина, и при этом полисорбат 80 добавляют на этапе с) до конечной концентрации от примерно 0,01 до примерно 0,07% (масс/об).

10. Фармацевтическая композиция, полученная способом по п. 8 или п. 9.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, при этом значение pH композиции составляет от примерно 4,6 до примерно 5,5.

12. Контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пунктов 1-7, 10 или 11.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-7, 10 или 11 для использования в терапии.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-7, 10 или 11 для использования в лечении или профилактике патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F.

15. Применение фармацевтической композиции по любому из пунктов 1-7, 10 или 11 в производстве лекарственного препарата для лечения или

профилактики патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F.

16. Способ лечения или предотвращения патологического заболевания, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или которое связано с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F, у субъекта-млекопитающего, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пунктов 1-7, 10 или 11.

17. Фармацевтическая композиция для применения по п. 14, применения по п. 15 или способа по п. 16, при этом патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, псориазического артрита, системного ювенильного идиопатического артрита (JIA), системной красной волчанки (SLE), астмы, хронической обструктивной болезни дыхательных путей, хронической обструктивной болезни легких, atopического дерматита, склеродермии, системной склеродермии, фиброза легких, болезни Крона, язвенного колита, анкилозирующего спондилита, аксиального спондилоартрита и других спондилоартропатий.

18. Фармацевтическая композиция для применения по п. 14, применения по п. 15 или способа по п. 16, при этом патологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, псориаза, псориазического артрита, анкилозирующего спондилита и аксиального спондилоартрита.

По доверенности