

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092508 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.16

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

(22) Дата подачи заявки
2019.04.24

(54) СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К PD-L1 ЧЕЛОВЕКА

(31) 62/662,324

(32) 2018.04.25

(33) US

(86) PCT/EP2019/060498

(87) WO 2019/206987 2019.10.31

(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

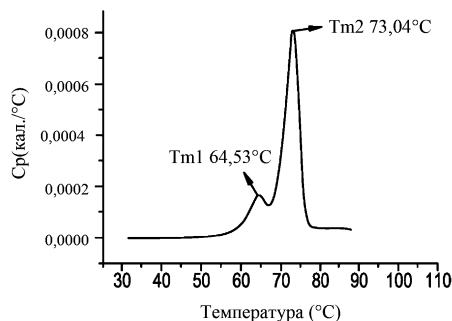
(72) Изобретатель:

Бидлкомб Джеймс (GB), Мейн
Дженни, Ду Цзяли, Албаргутхи
Метхал (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к составам и композициям на основе антитела, направленного против антитела к PD-L1 человека, такого как дурвалумаб.



A1

202092508

202092508

A1

СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К PD-L1 ЧЕЛОВЕКА

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к составам и композициям на основе антитела, направленного против антитела к PD-L1 человека, такого как дурвалумаб.

2. Уровень техники

Лиганд 1 программируемой гибели клеток (PD-L1), также известный как B7H1, представляет собой трансмембранный белок массой 40 кДа, который представляет основное препятствие для противоракового иммунитета. Связывание PD-L1 с рецептором программируемой гибели (PD-1) приводит к деактивации Т-клеток, защищает клетки опухоли и подавляет способность иммунной системы к обнаружению, допуская неконтролируемую пролиферацию раковых клеток. PD-L1 также связывает CD80, костимулирующую молекулу.

В большом диапазоне типов онкогенных и активированных иммунных клеток естественным образом экспрессируется PD-L1, включая антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, моноциты, В-клетки, Т-клетки и клетки, не являющиеся гемопоэтическими. Кроме того, воспалительные цитокины, такие как интерферон гамма ($IFN\gamma$), могут индуцировать экспрессию PD-L1. Например, активированные Т-клетки продуцируют $IFN\gamma$, который является наиболее сильным индуктором экспрессии PD-L1. Экспрессия PD-L1, индуцированная посредством $IFN\gamma$, способствует защите опухоли, которая представляет собой механизм, известный как адаптивная иммунная устойчивость.

Одна стратегия для противодействия адаптивной иммунной устойчивости и летальности PD-L1 представляет собой использование антител к PD-L1. В соответствии с данным подходом дурвалумаб, представляющий собой антитело к PD-L1, которое представляет собой тройной мутант (ТМ) моноклонального IgG1 к PD-L1 массой 149 кДа с оптимизированной аффинностью, который препятствует связыванию PD-L1 с PD-1, может использоваться для устранения иммунодепрессивных эффектов PD-L1 в отношении цитотоксических Т-клеток. Результатом является смягчение отрицательных ингибирующих сигналов, которые способствуют росту опухоли и усилению противоопухолевого иммунитета, ответов, которые усиливают цитолиз опухолевых клеток с помощью иммунной системы.

Важно отметить, что буферные составы на основе антитела к PD-L1, которые поддерживают стабильность жидкого лекарственного вещества и лиофилизированного лекарственного препарата, являются важными для эффективности антител к PD-L1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает состав на основе антитела, содержащий от 40 мг/мл до 50 мг/мл антител к PD-L1, от 15 мМ до 35 мМ буфера, от 255 мМ до 275 мМ дисахарида, от 0,01% (вес/об.) до 0,05% (вес/об.) поверхностно-активного вещества, и при этом pH состава составляет от приблизительно pH 5,5 до приблизительно pH 7,2.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает состав на основе антитела, содержащий 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 26 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет pH 6,0.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает состав на основе антитела, содержащий 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно pH 5,5.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает состав на основе антитела, содержащий 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно pH 6,5.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает состав на основе антитела, содержащий 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,04% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно pH 6,0.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает состав на основе антитела, содержащий 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ сахарозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно pH 6,0.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную

последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка, в композиции, как измерено с применением капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) в отношении композиции.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка, в композиции, как измерено с применением сIEF в отношении композиции, и кислотные формы антитела, составляющие от 45% до 50% белка в композиции, как измерено с применением сIEF в отношении композиции.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка, в композиции, как измерено с применением сIEF в отношении композиции, и основную форму антитела, составляющую от 18% до 23% белка в композиции, как измерено с применением сIEF в отношении композиции.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка, в композиции, как измерено с применением сIEF в отношении композиции, кислотные формы антитела, составляющие от 45% до 50% белка в композиции, как измерено с применением сIEF в отношении композиции, и основную форму антитела, составляющую от 18% до 23% белка в композиции, как измерено с применением сIEF в отношении композиции.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и при этом гликановые структуры антитела к PD-L1 предусматривают гликоформы G0f, G1f, G2f и G0.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, от 1,5% до 2,5% антител к PD-L1, образующих агрегат, как определено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SPEC), и от 97% до 98% антител к PD-L1 представленных в виде мономеров, как измерено посредством HP-SEC.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 продемонстрировано схематическое изображение этапов разработки состава дурвалумаба.

На фигуре 2 продемонстрирован профиль дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) дурвалумаба при 3 мг/мл в буферном составе (26 mM гистидин/гистидин-HCl, 275 mM дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, pH 6,0), при этом было продемонстрировано, что T_{m1} составляет 64,5°C, и было продемонстрировано, что T_{m2} составляет 73,04°C.

На фигуре 3 представлен профиль капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF) дурвалумаба в буферном составе (26 mM гистидин/гистидин-HCl, 275 mM дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, pH 6,0). Четыре пика демонстрируют диапазон pI от 8,3 до 8,8. Основной пик характеризуется pI 8,6.

На фигуре 4 продемонстрирована стабильность клона 1 или клона 2 дурвалумаба в жидкости после инкубации в течение 1 месяца при 5°C или 40°C в буферном составе (26 mM гистидин/гистидин-HCl, 275 mM дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, pH 6,0).

На фигурах 5А - 5С изображены электроферограммы дурвалумаба после трех месяцев хранения при 5°C (Фиг. 5А), 25°C (Фиг. 5В) и 40°C (Фиг. 5С). Имел место дополнительный пик пироглутаминовой кислоты после 3 месяцев хранения при 25°C и 40°C.

На фигуре 6 продемонстрирован результат микроскопии посредством сублимационной сушки, показывающий температуру возникновения распада и температуру полного распада дурвалумаба в буферном составе (26 мМ гистидин/гистидин-НCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, рН 6,0).

На фигуре 7 изображена термограмма DSC, показывающая температуру перехода в стеклообразное состояние (T_g') дурвалумаба в буферном составе (26 мМ гистидин/гистидин-НCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, рН 6,0).

На фигуре 8 представлена модель процесса, созданная с помощью проектного поля. В экспериментальном плане используется измененная температура первичного высушивания, давление, время первичного высушивания и максимальная температура продукта. Обозначены средняя точка цикла (точка) и устойчивость процесса (светлая область треугольной формы) вокруг давления в камере и температуры полки.

На фигуре 9 продемонстрированы данные цикла лиофилизации NMF дурвалумаба, в котором сходимость показателей вакуумметра Пирани (дельта 10 мкбар) возникает на примерно через 103 часа во время стадии высушивания, состоящей из 115 часов. Это эквивалентно 10% предела безопасности.

На фигуре 10 продемонстрирован больший масштаб проведения цикла лиофилизации NMF в сублимационной сушилке Amsco. Результаты показывают сходимость показателей, полученных с помощью термопары продукта, в течение назначенного первичного времени.

На фигуре 11 продемонстрированы результаты визуализации микропотока (MFI) исследований встряхивания дурвалумаба.

На фигуре 12 продемонстрирован пик идентификации ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) меченных 2-АВ олигосахаридов на дурвалумабе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к составам и композициям на основе антитела, направленного против антитела к PD-L1, такому как дурвалумаб.

Используемые в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения. Если согласно контексту не требуется иное, выражения в единственном числе будут охватывать формы множественного числа, и выражения во множественном числе будут включать форму единственного числа.

Термин "антитело", используемый в данном документе, относится к белку, который способен к распознаванию и специфическому связыванию с антигеном. Стандартные или традиционные антитела млекопитающих содержат тетрамер, который, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара состоит из одной "легкой" цепи (как правило, имеющей молекулярную массу приблизительно 25 кДа) и одной "тяжелой" цепи (как правило, имеющей молекулярную массу приблизительно 50-70 кДа). Термины "тяжелая цепь" и "легкая цепь", применяемые в данном документе, относятся к любому полипептиду иммуноглобулина, имеющему соответствующую последовательность вариабельного домена для придания специфичности антигену-мишени. Амино-концевая часть каждой легкой и тяжелой цепи, как правило, включает вариабельный домен из от приблизительно 100 до 110 или больше аминокислот, который, как правило, отвечает за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи, как правило, определяет константный домен, ответственный за эффекторную функцию. Таким образом, в антителе, встречающемся в природе, полноразмерная тяжелая цепь полипептида иммуноглобулина включает вариабельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3), и шарнирную область между CH1 и CH2, при этом домен VH расположен на амино-конце полипептида и домен CH3 расположен на карбоксильном конце, при этом полноразмерная легкая цепь полипептида иммуноглобулина включает вариабельный домен (VL) и константный домен (CL), при этом домен VL расположен на амино-конце полипептида и домен CL расположен на карбоксильном конце.

В полноразмерных легких и тяжелых цепях вариабельные и константные домены, как правило, соединены с помощью "J"-области, состоящей из приблизительно 12 или больше аминокислот, с тяжелой цепью, также включающей "D"-область, состоящую из приблизительно 10 или больше аминокислот. Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь, как правило, образуют антигенсвязывающий участок. Вариабельные домены антител, встречающихся в природе, как правило, демонстрируют такую же основную структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), связанных

посредством трех гипервариабельных областей, также называемых областями, определяющими комплементарность или CDR. CDR из двух цепей каждой пары, как правило, выравнивают с помощью каркасных областей, что может обеспечить связывание с конкретным эпитопом. От amino-конца до карбоксильного конца вариабельные домены как легкой, так и тяжелой цепей, как правило, содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Составы на основе антитела, раскрытые в данном документе, содержат антитело к PD-L1. В конкретных вариантах осуществления состав содержит 30 мг/мл, 35 мг/мл, 40 мг/мл, 45 мг/мл, 50 мг/мл, 55 мг/мл или 60 мг/мл антитела к PD-L1. В других вариантах осуществления состав содержит от 40 мг/мл до 50 мг/мл антител к PD-L1. В других вариантах осуществления состав содержит 50 мг/мл антитела к PD-L1. В конкретных вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 человека.

Составы на основе антитела, раскрытые в данном документе, содержат один или несколько буферов. Применяемый в данном документе "буфер" относится к вспомогательному веществу для поддержания pH состава. В конкретных вариантах осуществления буфер является буфером гистидин/гистидин-HCl. Буфер представлен в концентрации приблизительно 15 mM, 20 mM, 25 mM или 30 mM. В конкретных вариантах осуществления концентрация буфера составляет 26 mM.

В конкретных вариантах осуществления составы на основе антитела содержат дисахарид. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой дигидрат трегалозы или сахарозу. Дисахарид представлен в концентрации приблизительно 250 mM, 255 mM, 260 mM, 265 mM, 270 mM, 275 mM или 280 mM. В конкретных вариантах осуществления концентрация дисахарида составляет 265 mM. В других вариантах осуществления концентрация дисахарида составляет 275 mM.

В конкретных вариантах осуществления составы на основе антитела содержат поверхностно-активное вещество. Термин "поверхностно-активное вещество", используемый в данном документе, относится к органическим веществам, характеризующимся амфипатическими структурами; а именно, такие вещества состоят из групп, имеющих противоположные тенденции растворимости, обычно маслорастворимой углеводородной цепи и водорастворимой ионной группы. В зависимости от заряда поверхностно-активного компонента поверхностно-активные вещества могут быть классифицированы на анионные, катионные и неионогенные поверхностно-активные

вещества. Поверхностно-активные вещества часто применяются в качестве смачивающих, эмульгирующих, солюбилизирующих и диспергирующих средств для различных фармацевтических составов и препаратов биологических материалов. В конкретных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80. Поверхностно-активное вещество представлено при концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5% (по объему).

В конкретных вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, представлен состав на основе антитела, содержащий от 40 мг/мл до 50 мг/мл антител к PD-L1, от 15 мМ до 35 мМ буфера, от 255 мМ до 275 мМ дисахарида, от 0,01% (вес/об.) до 0,05% (вес/об.) поверхностно-активного вещества, и при этом pH состава составляет от приблизительно pH 5,5 до приблизительно pH 7,2. В конкретных вариантах осуществления состав на основе антитела содержит 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 26 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно 6,0. В других вариантах осуществления состав на основе антитела содержит 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно 5,5. В других вариантах осуществления состав на основе антитела содержит 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно 6,5. В других вариантах осуществления состав на основе антитела содержит 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,04% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно 6,0. В других вариантах осуществления состав на основе антитела содержит 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ сахарозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно 6,0. В других вариантах осуществления состав на основе антитела содержит 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека, 25 мМ буфера гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ сахарозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, и при этом pH состава составляет приблизительно 6,0.

В конкретных вариантах осуществления антитело к PD-L1 человека содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления антитело к PD-

L1 человека содержит CDR1 VH, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, CDR2 VH, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, CDR3 VH, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, CDR1 VL, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, CDR2 VL, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и VL CDR3 VL, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления антитело к PD-L1 человека содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая менее чем на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая менее чем на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления антитело к PD-L1 человека содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90% идентичностью последовательности, 91% идентичностью последовательности, 92% идентичностью последовательности, 93% идентичностью последовательности, 94% идентичностью последовательности, 95% идентичностью последовательности, 96% идентичностью последовательности, 97% идентичностью последовательности, 98% идентичностью последовательности или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90% идентичностью последовательности, 91% идентичностью последовательности, 92% идентичностью последовательности, 93% идентичностью последовательности, 94% идентичностью последовательности, 95% идентичностью последовательности, 96% идентичностью последовательности, 97% идентичностью последовательности, 98% идентичностью последовательности или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2.

Термины "MEDI4736" и "дурвалумаб", применяемые в данном документе, относятся к антителу, которое селективно связывает антитело к PD-L1 человека и блокирует связывание PD-L1 с PD-1 и рецепторами CD80, как раскрыто в патентах США № 8779108 и 9493565, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Домен дурвалумаба, представляющий собой кристаллизующийся фрагмент (Fc), содержит тройную мутацию в константном домене тяжелой цепи IgG1, которая

уменьшает связывание с компонентом C1q системы комплемента и Fcγ-рецепторами, отвечающими за опосредование антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). Дурвалумаб может ослаблять PD-L1-опосредованное подавление активации Т-клеток человека *in vitro* и ингибировать рост опухоли в ксенотрансплантатной модели посредством Т-клеточно-зависимого механизма.

Применяемые в данном документе фразы "фармацевтический состав", "состав" и "состав на основе антитела" применяются взаимозаменяемо и относятся к композиции, содержащей антитело к PD-L1, и одному или нескольким подходящим буферам и/или вспомогательным веществам. Соответственно, описанные в данном документе фармацевтические составы являются "фармацевтически приемлемыми" и, таким образом, будут соответствовать необходимым утвержденным требованиям, требуемым Регулирующим органом Федерального правительства или правительства штата или перечисленным в Фармакопее США, Европейской фармакопее или другой общепризнанной фармакопее с тем, чтобы подлежать применению у животных, а более конкретно у людей.

Составы на основе антитела, раскрытые в данном документе, могут быть составлены в форме жидкого состава, замороженного состава, лиофилизированного состава или восстановленного состава.

Лиофилизация может происходить посредством высушивания в печи, вакуумного центрифугирования или с помощью других способов, известных специалисту в данной области техники. Лиофилизированный дурвалумаб сохраняет активность антитела к PD-L1 при восстановлении.

Термины "стабильность" и "стабильный" применяемые в данном документе в контексте состава, содержащего антитело к PD-L1, относятся к устойчивости антитела в составе к агрегации, разрушению или фрагментации при данном способе изготовления, получения, транспортировки и условиях хранения. "Стабильные" составы сохраняют биологическую активность при данном способе изготовления, получения, транспортировки и условиях хранения. Стабильность антитела можно оценить по степени агрегации, разрушения или фрагментации, что измеряется посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC), статического светорассеяния (SLS), инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR), кругового дихроизма (CD), методик разворачивания с использованием мочевины, флуоресценции собственного триптофана, дифференциальной сканирующей калориметрии и/или методик связывания

ANS по сравнению с эталонным составом. Общую стабильность состава, содержащего антитело к PD-L1 человека, можно оценить с помощью различных иммунологических анализов, включающих, например, ELISA и радиоиммуноанализ с применением выделенных молекул антигена.

В конкретных вариантах осуществления менее чем приблизительно 1% антител к PD-L1 образуют агрегат при хранении при 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как определено посредством HP-SEC. В других вариантах осуществления по меньшей мере 97% антител к PD-L1 человека представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством HP-SPEC. В других вариантах осуществления по меньшей мере 99% антител к PD-L1 человека представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством HP-SPEC. В других вариантах осуществления по меньшей мере 98% антител к PD-L1 человека представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 5° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством HP-SPEC. В конкретных вариантах осуществления стабильность состава на основе антитела сохраняется после по меньшей мере трех циклов замораживания/размораживания.

В конкретных вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; и при этом главная форма антитела, составляет 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF) в отношении композиции. В других вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; при этом главная форма антитела, составляет 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции; и при этом кислотные формы антитела составляют от 45% до 50% белка в

композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции. В других вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; при этом главная форма антитела, составляет 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции, и при этом основная форма антитела составляет от 18% до 23% белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции. В других вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; при этом главная форма антитела, составляет 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции, при этом кислотные формы антитела, составляют от 45% до 50% белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции; и при этом основная форма антитела составляет от 18% до 23% белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции.

В конкретных вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; и при этом гликановые структуры антитела к PD-L1 предусматривают гликоформы G0f, G1f, G2f и G0. В других вариантах осуществления гликановые структуры антитела к PD-L1 характеризуются содержанием форм G0f, G1f, G2f и G0, составляющим более приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления композиция антитела к PD-L1 характеризуется содержанием G0f, составляющим приблизительно 65-75%, содержанием G1f, составляющим приблизительно 13-23%, содержанием G2f, составляющим приблизительно 0-3%, и содержанием G0, составляющим приблизительно 0-4%. В других

вариантах осуществления композиция антитела к PD-L1 характеризуется содержанием G0f, составляющим приблизительно 71,9%, содержанием G1f, составляющим приблизительно 18,4%, содержанием G2f, составляющим приблизительно 1,5%, и содержанием G0, составляющим приблизительно 1,9%.

В конкретных вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; где от 1,5% до 2,5% антител к PD-L1, образующих агрегат, определенный посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SPEC), и где от 97% до 98% антител к PD-L1 представленных в виде мономеров, как измерено посредством HP-SEC.

Без ограничения данного изобретения ряд вариантов осуществления настоящего изобретения описан ниже с целью иллюстрации. Следующие примеры являются иллюстрацией конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и их различных способов применения. Примеры изложены только с целью пояснения и не должны приниматься в качестве ограничения настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1

Материалы и способы

1. Определение концентрации белка

Концентрации белка дурвалумаба определяли путем измерения поглощения при 280 нм с помощью спектрофотометра Agilent UV-V. Разведения проводили в буферном составе. Концентрации белка рассчитывали с использованием теоретического коэффициента экстинкции 1,55 (мг/мл)⁻¹ см⁻¹. В подгруппах определений при расчете применяли экспериментальный коэффициент 1,52 (мг/мл)⁻¹ см⁻¹.

2. Анализ посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC)

Образцы для анализа HP-SEC сначала элюировали изократически с помощью 0,1 М фосфата динатрия, содержащего 0,1 М сульфата натрия, pH 6,8, при скорости потока 1,0 мл/минута. Элюированный белок выявляли при поглощении 280 нм. Результаты представляли как процент площади пика мономера продукта по сравнению со всеми другими пиками. Пик, относящийся к буферу, наблюдаемый через примерно 12 минут, был исключен из представленных результатов. Любые пики, которые элюировали раньше,

чем пик мономера, записывали как процент агрегата. Пики, элюированные после пика мономера, записывали как процент фрагментов.

3. Визуальный анализ

Посредством изучения стеклянных пробирок проводили визуальную проверку образца на цвет, прозрачность и наличие взвешенных и волокнистых частиц с применением негатоскопа с помощью светлого и темного фона. Оценивали видимые частицы и прозрачность.

4. Анализ видимых частиц с помощью высокоточного (НЛАС) счетчика жидких частиц

Образцы разбавляли до 5 мг/мл отфильтрованным буферным составом и затем обеспечивали осаждение в течение 30 минут перед анализом. Образцы получали в пробирках Falcon, трижды промытых сверхчистой водой. Образцы с концентрацией белка <5 мг/мл анализировали без примесей. Шесть показаний для каждого образца получали с применением Pacific Standard HIAC Roysco 3000A и 8-канального счетчика частиц 8000A. Среднее из трех конечных показаний записывали как конечное количество невидимых невооруженным глазом частиц. Записывали количество кумулятивных частиц > 10 – 25 мкм.

5. Осмоляльность и pH

Осмоляльность измеряли с применением осмометра Gonotec Osmomat 030-D. pH раствора измеряли с применением pH-метра PHM220 Lab.

6. Анализ по методу Карла Фишера

Присутствие остаточной воды в высушенном посредством сублимации составе измеряли с применением титрования по Карлу Фишеру (Mettler Toledo). Высушенный посредством сублимации материал восстанавливали с применением сухого метанола. Количество остаточной воды определяли на основе количества воды в сухом метаноле и веса всего твердого вещества.

7. Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF)

Образцы доводили до 0,25 мг/мл с помощью воды фармацевтической степени чистоты для HPLC. Образцы расщепляли с помощью карбоксипептидазы В (CBP) в течение 10 минут при 37°C, затем разбавляли 1% раствором метилцеллюлозы, Pharmalyte, pH 3 – 10, маркер pI 9,46 и маркер pI 5,85. Образцы загружали в анализатор iCE280 и фокусировали при 1500 В в течение 1 минуты, а потом при 3000 В в течение 7 минут.

Результаты электроферогаммы анализировали с применением программного обеспечения EZChrom и сравнивая с эталонным стандартом.

8. Гель-электрофорез в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях

Биоанализатор Agilent 2100 с технологией Protein 230 LabChip (Agilent) применяли для анализа дурвалумаба посредством гель-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Каналы LabChip позволяют осуществлять разделение, окрашивание, обесцвечивание и обнаружение. Образцы и стандарты доводили до 4 мг/мл в PBS и смешивали 1:1 с буфером на основе SDS для денатурации образцов в присутствии 60 мМ N-этилмалеимида (невосстановленного) или 60 мМ дитиотреитола (восстановленного). Затем образцы нагревали, центрифугировали, разбавляли в воде и загружали в лунку LabChip. В первом измерении белки разделяли с разрешением, сопоставимым с 4 – 20% градиентным гелем. Белки разделяли во втором измерении по молекулярной массе. Возбуждение флуоресцентного красителя в буфере для образца происходило при 633 нм.

9. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) применяли для определения температуры плавления (T_m).

10. Вязкость

Вязкость образцов и буферов измеряли с применением вискозиметра Anton Paar AMVn. Измерения проводили при целевых концентрациях.

11. Анализ аминокислотной последовательности для "горячих точек"

Аминокислотную последовательность дурвалумаба анализировали с применением программного обеспечения BLAZE для идентификации аминокислотных остатков для "горячих точек" или сайтов потенциальной модификации. Реакционной способности "горячей точки" присваивали оценку риска высокого, среднего или низкого соответствия с критерием проблемности последовательностей на основе наблюдений за другими моноклональными антителами.

12. Идентификация N-связанных олигосахаридов в дурвалумабе

N-связанные олигосахариды в дурвалумабе, выявленные как значительные пики в ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (UPLC), идентифицировали с применением системы UPLC Waters с детектором FLR. Эталонные стандарты дурвалумаба (10,2 мг/мл; 100 мкг), составленные в 26 мМ гистидин/гистидин-HCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, pH 6,0, восстанавливали до 0,5 мг/мл

в 50 мМ Tris-буфере (pH 7,8). Образцы расщепляли с помощью 2 мкл ПНГазы F (Promega), метили с помощью флуоресцентной метки 2-аминобензамида (2-AB; Sigma-Aldrich), очищали с помощью картриджа HILIC SPE и элюировали в воде для определения профиля UPLC. Меченные 2-AB олигосахариды дополнительно расщепляли с помощью различных экзо-гликозидов, в том числе фукозидазы, сиалидазы А, маннозидазы, β -галактозидазы и β -N-ацетилгексозоаминидазы, для идентификации пика.

Образцы инъецировали в колонку Acquity UPLC® BEH Glycan (1,7 мМ, 2,1 x 150 мм) в системе UPLC Waters с применением 50 мМ формиата аммония, pH 4,4, в качестве подвижной фазы А и 100% ацетонитрила в качестве подвижной фазы В. Получали данные и профили образцов, расщепленных гликозидазой, тщательно сравнивали в отношении нерасщепленных образцов для идентификации гликанов и их олигосахаридных связей.

ПРИМЕР 2

Исследование возможности разработки

Состав дурвалумаба определяли с помощью следующего исследования возможности разработки, которое включало анализ "горячих точек", определение температуры плавления, изоэлектрической точки (pI) и стабильности (фиг. 1).

1. Анализ "горячих точек"

Стабильность дурвалумаба при хранении важна для эффективности моноклонального антитела. Риском при хранении антитела является потеря активности через первичный путь разрушения посредством агрегации. Дополнительно модификация аминокислотного остатка из-за длительного хранения может повлиять на стабильность и активность антитела.

Потерю активности дурвалумаба оценивали посредством гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). Потерю активности не наблюдали после инкубация при 40°C в течение 1 месяца в обоих буферах при высоком и низком pH. Только следовые уровни Asp-изомеризации при D54(G) определяли посредством пептидного картирования после 1 месяца в буфере с pH 6,0 при 40°C.

2. Определение температуры плавления, изоэлектрической точки (pI) и стабильности

Точку плавления антитела определяли с применением дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) в отношении дурвалумаба при 3 мг/мл в буферном составе. pI и стабильность дурвалумаба определяли с применением капиллярного

изоэлектрического фокусирования и эксклюзионной хроматографии высокого давления (HPSEC) соответственно.

Профиль DSC дурвалумаба показан как T_{m1} при 64,5°C и T_{m2} при 73,04°C (фиг. 2). Четыре пика, находящиеся в диапазоне 8,3 – 8,8, определяли в профиле капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) дурвалумаба. Основной пик характеризовался изоэлектрической точкой 8,6 (фиг. 3). Исследования стабильности жидкости показали, что клон 1 и клон 2 были устойчивы в базовом составе в следующий 1 месяц инкубации при либо 5°C, либо 40°C (фиг. 4). Результаты исследования возможности разработки обобщены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты исследования возможности разработки

Описание	Результаты
Состав	26 mM гистидин/гистидин-HCl, 275 mM дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) P80, pH 6,0
Клоны	130.174 (SP11-006), 272.253 (SP10-011), без значительной разницы между двумя клонами. Клон 130.174, выбранный для разработки
Капиллярная DSC	T_{m1} : 64,5°C, T_{m2} : 73,0°C (фиг. 2)
сIEF	Основной пик: 8,6, диапазон 8,3 – 8,8, количество пиков: 4 (фиг. 3)
Ускоренное исследование стабильности (1 месяц, HP-SEC)	40°C: ~1 месяц 2-8°C: без изменения Первичный путь разрушения: агрегация
Визуальная проверка	Практически не содержит видимых частиц

ПРИМЕР 3

Лиофилизированный состав

Пять составов подвергали скринингу для оценки стабильности жидкого лекарственного вещества и лиофилизированного лекарственного препарата. Составы, которые подвергали скринингу, показаны в таблице 2.

Применяли исходный уровень P80 (т. е., 0,02% вес/об.). Во время последующего скрининга состава лиофилизированный состав, 0,04% (вес/об.) P80 (состав 4) также включали в случае, если наблюдали частицы при восстановлении состава, содержащего 0,02% (вес/об.) P80. На основе данных этого исследования было обнаружено, что 0,02%

(вес/об.) P80 представляет собой оптимальный уровень поверхностно-активного вещества для дурвалумаба.

Таблица 2. Составы, подвергавшиеся скринингу

Состав №	Состав
1	25 мМ гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) P80, pH 5,5
2	26 мМ гистидин/гистидин-HCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) P80, pH 6,0
3	25 мМ гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) P80, pH 6,5
4	25 мМ гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ дигидрата трегалозы, 0,04% (вес/об.) P80, pH 6,0
5	25 мМ гистидин/гистидин-HCl, 265 мМ сахарозы, 0,02% (вес/об.) P80, pH 6,0

Составы лиофилизировали для исследования с проведением скрининга состава. Составы подвергали заморозке, отжигу, первичному высушиванию и вторичному высушиванию в сублимационной сушилке Virtis Genesis 25EL. Параметры цикла лиофилизации поданы в таблице 3.

Таблица 3. Параметры цикла лиофилизации для скрининга лиофилизированного состава

Стадия	Температура полки (°C)	Давление (мторр)	Время (минуты)
Заморозка	-40	Не определено	120
Отжиг	-8	Не определено	60
Первичная сушка	-25	100	Контроль тестирования повышения давления
Вторичная сушка	20	200	720

1. Стабильность

После 1 месяца при 40°C все лиофилизированные составы характеризовались показателями потери мономера <0,3% в месяц (таблица 4А). При 5°C показатель потери

мономера в месяц для всех составов составлял $<0,1\%$ в месяц. Все составы были эквивалентны в отношении агрегации после 4 недель при 40°C (таблица 4В). Агрегация не была представлена в любом из составов после 4 недель при 40°C (таблица 4С).

Исследование замораживания-размораживания проводили на всех пяти составах. Составы подвергали 0, 1 и 3 циклам замораживания-размораживания, состоящим из заморозки при -70°C и размораживания при температуре окружающей среды. Образцы проверяли визуально и анализировали посредством HP-SEC по окончании циклов. Результаты HP-SEC не показывают значительного изменения чистоты посредством HP-SEC в любом образце. Все образцы фактически не содержали видимых частиц после трех циклов.

Таблица 4А. Процент образования мономеров в составах дурвалумаба

Образец	Температура.	% мономеров/недели			Тенденция	
		0	2	4	Еженедельно	Ежемесячно
Состав 1	40°C	99,41	99,12	99,16	-0,06	-0,25
Состав 2	40°C	99,38	99,17	99,11	-0,07	-0,27
Состав 3	40°C	99,44	99,24	99,18	-0,07	-0,26
Состав 4	40°C	99,32	99,17	99,13	-0,05	-0,20
Состав 5	40°C	99,40	99,31	99,30	-0,03	-0,10

Таблица 4В. Процент агрегации в составах дурвалумаба

Образец	Температура	% агрегатов/недели			Тенденция	
		0	2	4	Еженедельно	Ежемесячно
Состав 1	40°C	0,59	0,88	0,84	0,06	0,25
Состав 2	40°C	0,62	0,83	0,89	0,07	0,27
Состав 3	40°C	0,56	0,76	0,82	0,07	0,26
Состав 4	40°C	0,68	0,83	0,87	0,05	0,20
Состав 5	40°C	0,60	0,69	0,7	0,03	0,10

Таблица 4С. Процент агрегации в составах дурвалумаба

Образец	Температура	% фрагментов/недели			Тенденция	
		0	2	4	Еженедельно	Ежемесячно
Состав 1	40°C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Состав 2	40°C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Состав 3	40°C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Состав 4	40°C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Состав 5	40°C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

2. Стабильность после восстановления

Все пять лиофилизированных составов тестировали в отношении стабильности после восстановления в течение периода до 24 часов хранения при 5°C и 25°C. Ни один из пяти составов не демонстрировал изменение количества видимых частиц или значительное уменьшение чистоты мономера, оцененное посредством SEC-HPLC. Результаты при T0 показаны в таблице 5А, 24 часа при 5°C в таблице 5В и 24 часа при 25°C в таблице 5С.

Таблица 5А. Стабильность после восстановления (T0)

T0					
Состав	1	2	3	4	5
Визуальная проверка	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит
SEC-HPLC (% мономеров)	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4

Таблица 5В. Стабильность после восстановления (24 ч. при 5°C)

T = 24 ч., 5°C					
Состав	1	2	3	4	5
Визуальная проверка	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит
SEC-HPLC (% мономеров)	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4

Таблица 5С. Стабильность после восстановления (24 ч. при 25°C)

Т = 24 ч., 25°C					
Состав	1	2	3	4	5
Визуальная проверка	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит	Практически не содержит
SEC-HPLC (% мономеров)	99,4	99,4	99,3	99,4	99,4

3. Исследование замораживания-размораживания для дурвалумаба в 26 мМ гистидин/гистидин-НCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, pH состава 6,0

Разрушение структуры антитела, относящееся к повторным циклам замораживания/размораживания, оценивали для проверки стабильности дурвалумаба. В соответствии с этим стабильность дурвалумаба тестировали с применением исследований замораживания-размораживания.

Исследования замораживания-размораживания несоставленного лекарственного вещества (UDS) на основе дурвалумаба проводили на составах (26 мМ гистидин/гистидин-НCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, pH 6,0). Дурвалумаб подвергали 0, 1 и 3 циклам неконтролируемого замораживания-размораживания в 8 мл бутылках Nalgene, заполненных 5,6 мл или в 30 мл пакетах Celsius Pak, заполненных 20 мл. Бутыли Nalgene замораживали при -80°C и пакеты Celsius Pak при -40°C, при этом размораживания обоих проводят при температуре окружающей среды. Затем образцы анализировали в отношении чистоты с помощью анализа эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC), при этом концентрацию белка определяли при A280, а внешний вид оценивали после каждого цикла замораживания-размораживания.

Было обнаружено, что дурвалумаб является стабильным после 3 циклов замораживания-размораживания, как показано в таблице 6А (бутыли Nalgene) и 6В (Celsius Pak) ниже.

Таблица 6А. Результаты замораживания/размораживания дурвалумаба в бутылках Nalgene

Цикл замораживания/размораживания	HPSEC (% мономеров)	Визуальная проверка		A280 (мг/мл)
		Оператор 1	Оператор 2	
0	99,3%	Практически не содержит	Практически не содержит	49,8
1	99,3%	Практически не содержит	Практически не содержит	50,4
3	99,3%	Практически не содержит	Практически не содержит	50,5

Таблица 6В. Результаты замораживания/размораживания дурвалумаба в Celsius Pak

Цикл замораживания/размораживания	HPSEC (% мономеров)	Визуальная проверка		A280 (мг/мл)
		Оператор 1	Оператор 2	
0	99,3%	Практически не содержит	Практически не содержит	49,8
1	99,3%	Практически не содержит	Практически не содержит	50,9
3	99,3%	Практически не содержит	Практически не содержит	50,7

Эти результаты указывают на то, что дурвалумаб был стабильным после повторных циклов замораживания/размораживания в бутылках Nalgene и Celsius Pak.

ПРИМЕР 4

Образование и обнаружение пироглутаминовой кислоты

Дурвалумаб имеет N-концевую глутаминовую кислоту на тяжелой и легкой цепях. С течением времени глутаминовая кислота циклизуется до пироглутаминовой кислоты. Это превращение определяли в анализе cIEF как пик при pI 8,8 после трех месяцев хранения при 25°C и 40°C. Кроме того, пик возникал при 2 – 8°C после 24 месяцев хранения (фиг. 4). Циклизация происходила в лиофилизированных и жидких формах. Был получен

мутантный дурвалумаб, в результате чего было показано, что циклизация не оказывает влияния на активность антитела.

ПРИМЕР 5

Параметры и стабильность конечного лиофилизированного состава

Лиофилизированный состав, 26 мМ гистидин/гистидин-НСl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, рН 6,0, содержащий 50 мг/мл дурвалумаба. Параметры состава, 26 мМ гистидин/гистидин-НСl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 80, рН 6,0, показаны в таблице 7, и стабильность лиофилизированного лекарственного препарата в конечном составе представлена в таблице 8. Профиль растворимости лиофилизированного лекарственного вещества в конечном составе в полипропиленовых пробирках представлен в таблице 9.

Таблица 7. Параметры лекарственного препарата в составе 26 мМ гистидин/гистидин-НСl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 80, рН 6,0

Параметр	Значение
Контейнер и система укупорки	10R флакон из боросиликатного стекла, бромбутильная пробка для остановки лиофилизации, 20 мм алюминиевый откидной колпачок
Номинальный объем (мл)	4,5
Извлекаемый объем (мл)	~4,0
Стабильность лекарственного вещества для х циклов замораживания/размораживания	x = 3
Концентрация (мг/мл)	50
Плотность (г/см ³)	1,05
Осмоляльность (мосмоль)	360
рН	6,0
Вязкость при 20°C (мПа/с)	Только IV
рI (диапазон)	8,33 – 8,60
рI (количество пиков)	4 (+1 за счет пироглутаминовой кислоты)
T _{ml} (°C)	64,7
T _g ' (°C)	-27,1
Объем восстановления (мл)	4,0
Время восстановления (мин.)	5 – 10 мин.

Таблица 8. Профиль стабильности лиофилизированного лекарственного препарата в конечном составе

Анализ	Температура и длительность хранения		
	5°C (24 месяца)	25°C (6 месяцев)	40°C (6 месяцев)
HPSEC (% потери мономеров в месяц)	0,01	0,04	0,17
HPSEC (% агрегации в месяц)	0,01	0,04	0,17
HPSEC (% фрагментации в месяц)	0,00	0,00	0,00
Визуальная проверка (частиц)	Станд. 1	<Станд. 1	<Станд. 1
Визуальная проверка (прозрачности)	<Станд. 2	<Станд. 2	<Станд. 2
Визуальная проверка (цвета)	Y6	Y6	Y6
В восстанавливающих условиях BioA (% тяжелая + легкая цепь + направляющий пик тяжелой цепи)	99,7	98,7	100
BioA в невосстанавливающих условиях (% интактного IgG)	100	99,5	99,5
SVP (≥ 10 мкм частиц/мл)	47	33	427
SVP (≥ 25 мкм частиц/мл)	0	7	20
Метод Карла Фишера (% воды)	0,3	0,4	0,4
iCE (диапазон pI)	8,37 – 8,84	8,30 – 8,83	8,32 – 9,01
iCE (№ пиков)	5	5	5

Таблица 9. Профиль растворимости лиофилизированного лекарственного вещества в конечном составе в полипропиленовых пробирках

Анализ	Температура и длительность хранения		
	5°C (24 месяца)	25°C (6 месяцев)	40°C (6 месяцев)
HPSEC (% потери мономеров в месяц)	0,02	0,22	2,08
HPSEC (% агрегации в месяц)	0,02	0,15	1,52
HPSEC (% фрагментации в месяц)	0,00	0,07	0,56
Визуальная проверка (частиц)	Станд. 1	<Станд. 1	<Станд. 1
Визуальная проверка (прозрачности)	Станд. 1	Станд. 1	Станд. 1

Визуальная проверка (цвета)	<Y5	Y6	Y4
В восстанавливающих условиях BioA (% тяжелая + легкая цепь + направляющий пик тяжелой цепи)	99,8	96,2	100
BioA в невосстанавливающих условиях (% интактного IgG)	99,6	99,3	99,5
SVP (≥ 10 мкм частиц/мл)	67	60	73
SVP (≥ 25 мкм частиц/мл)	7	40	0
iCE (диапазон pI, основной пик)	8,35 – 8,83 (8,68)	8,23 – 8,80 (8,59)	8,08 – 8,69 (8,40)
iCE (№ пиков)	5	4	5

ПРИМЕР 6

Разработка цикла лиофилизации

Разработка цикла лиофилизации приводит к параметрам, показанным в таблице 10.

Таблица 10. Обзор результатов разработки цикла лиофилизации

Описание	Результаты
Состав	26 mM гистидин/гистидин-HCl, 275 mM дигидрата трегалозы, 0,02% (вес/об.) полисорбата 80, pH 6,0
Tg', полученная посредством DSC (стандарт, не модулированный)	-27,14°C
Tс, полученная посредством микроскопии с помощью сублимационной сушки	Tс возникновения: -33,0°C, Tс полного распада: -27,3°C
Сублимационная сушилка, применяемая для разработки цикла	Virtis Genie 25EL
Результат, полученный с помощью первичного способа высушивания	Испытание повышения давления
Укупорка контейнера	10R флаконы, 20 mM пробки Stelmi
Номинальный объем	4,5 мл
Целевое время высушивания	<7 дней, консервативный цикл

Применяли микроскопию с помощью сублимационной сушки для оценки температуры возникновения распада (-33°C) и полного распада ($-27,3^{\circ}\text{C}$; фиг. 6) в цикле лиофилизации. Была определена температура перехода в стеклообразное состояние (T_g'), составляющая $-27,14^{\circ}\text{C}$, посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC; фиг. 7).

Модель проектного поля процесса лиофилизации, созданную с помощью проектного поля, получали с применением Design Expert 7 с помощью подхода планирования эксперимента (DoE). Подход DoE применяли для достижения надежного, консервативного цикла, составляющего <7 дней. Выбранные условия цикла, представляющие собой среднюю точку (около T_g'), и четыре "угла" экспериментального пространства, представлены в таблице 11.

Таблица 11. Планирование эксперимента (DoE) для разработки цикла лиофилизации дурвалумаба

Порядок стандарт	Порядок циклов (рандомизированный)	Температура первичного высушивания ($^{\circ}\text{C}$)	Давление (мторр)	Время первичного высушивания (ч.)	Максимальная температура продукта ($^{\circ}\text{C}$)
5	1	-28	100	90,3	-29,5
1	2	-33	65	138,8	-33,2
3	3	-33	135	227,4	-33,5
2	4	-23	65	67,8	-28,3
4	5	-23	135	63,9	-26,5

Все экспериментальные циклы характеризовались одинаковыми скоростями изменения, температурами замораживания и вторичными условиями высушивания, описанными в конечном цикле. Конечные условия цикла лиофилизации дурвалумаба показаны в таблице 12.

Таблица 12. Конечные параметры цикла лиофилизации для цикла 1 дурвалумаба

Стадия	Нагревание/ изменение	Температу ра (°C)	Время (минут ы)	Давление (мбар)	Врем я (ч.)	Показате ль (°C/мин.)
Заморозка	H	20	60	-	1	
	R	-40	90	-	1,5	0,67
	H	-40	120	-	2	
	R	-10	60		1	0,5
	H	-10	120		2	
	R	-40	60		1	0,5
	H	-40	120		2	
Вакуум	H	-40	30	105	0,5	
Высушивание при 1°	R	-25	31	105	0,52	0,48
	H	-25	6900	105	115	
	R	20	225	105	3,75	0,20
Высушивание при 2°	H	20	720	105	12	
Закупоривание		5		850		
Разгрузка		20		Условия окружающ ей среды		
Всего			8536 мин., 142,3 часов, 5,9 дней			

Основными критериями разработки цикла лиофилизации были: (1) поддержание температуры продукта выше температуры распада (приблизительно эквивалентной T_g'); (2) обеспечение времени первичного высушивания не более 115 часов, чтобы продолжительность цикла не превышала шести дней; (3) обеспечение достаточной надежности увеличения масштаба (2-3°C температура полки и 40 мторр давление в камере).

Результаты экспериментальных циклов в таблице 11 приводит к проектному полю процесса лиофилизации. Проектное поле, созданное из пяти экспериментальных циклов, изображено на фиг. 8. Вкратце, определяли среднюю точку цикла и устойчивость процесса относительно температуры камеры и полки. Данные, полученные с помощью сублимационной сушилки NMF Edwards, показывают сходимость показателей

вакуумметра Пирани (дельта 10 мкбар) при примерно 103 часах в 115-часовой стадии первичного высушивания. Это эквивалентно примерно 10% предела безопасности (фиг. 9). Это согласуется с предыдущим циклом большого масштаба, в котором сублимационная сушилка Amsco показывает сходимость показателей, полученных с помощью термопары продукта, в течение назначенного первичного времени (фиг. 10).

ПРИМЕР 7

Разработка жидкого состава

1. Исследование посредством встряхивания для оптимизации уровней поверхностно-активного вещества

Оценивали пригодность жидкого состава полисорбата 80 с помощью исследования посредством встряхивания во флаконах. Образцы, содержащие 0, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04% и 0,05% (вес/об.) полисорбата 80, помещали в пробирки с объемным соотношением воздуха и жидкости в наихудшем случае 6,5 мл. Пробирки энергично встряхивали при 600 об./мин. в течение четырех часов при температуре окружающей среды. Образцы затем проверяли посредством визуального анализа, A280, BioA, HP-SEC и визуализации микропотока (MFI). Также анализировали контрольные пробирки, которые не встряхивали, помещенные при 2 - 8°C.

Никаких наблюдаемых изменений не было отмечено в чистоте, выраженной в процентах, анализируемой посредством BioA и HP-SEC. Концентрация, измеренная при A280, осталась без изменений в результате встряхивания. Анализ MFI показал, что все образцы характеризуются низкими уровнями невидимых невооруженным глазом частиц, имеющих размер >10 мкм и > 25 мкм (фиг. 11). Уровни невидимых невооруженным глазом частиц в целом были низкими во всех пробирках с 0,02% полисорбата 80, выбранным как оптимальный уровень поверхностно-активного вещества для жидкого состава.

2. Контролируемое исследование замораживания-размораживания

Состав 26 mM гистидин/гистидин-HCl, 275 mM дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 80, pH 6,0, подвергали пяти контролируемым циклам замораживания-размораживания, при этом размораживание происходило при 5°C, и заморозка происходила при -40°C. По окончании пятого цикла замораживания/размораживания определяли чистоту, внешний вид, количество невидимых невооруженным глазом частиц и концентрацию белка. Значительного изменения качества продукта после пятого цикла замораживания-размораживания не наблюдали (таблица 13).

Таблица 13. Результаты цикла замораживания/размораживания (состав 26 мМ гистидин/гистидин-НCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 80, pH 6,0)

Анализ	T=0	После 5х циклов замораживания-размораживания
Состав	26 мМ гистидин/гистидин-НCl, 275 мМ дигидрата трегалозы, 0,03% (вес/об.) полисорбата 80, pH 6,0	
Чистота (%), определенная посредством HP-SEC	99,7	99,7
Внешний вид	<Станд. 1	Станд. 1
Невидимые невооруженным глазом частицы, определенные с помощью НIAC (частицы на 10,5 мл контейнера)	2-10 мкм: 8960 ≥10 мкм: 630 ≥25 мкм: 0	2-10 мкм: 21840 ≥10 мкм: 980 ≥25 мкм: 70
Концентрация, измеренная при A280 (мг/мл)	51,8	52,8

3. Краткое описание стабильности состава

Профиль стабильности лиофилизированного лекарственного препарата в конечном составе представлен в таблице 14. Результаты демонстрируют, что лиофилизированный дурвалумаб в конечном составе остается стабильным после длительного хранения.

Таблица 14. Профиль стабильности лиофилизированного лекарственного препарата в конечном составе

Анализ	Температура и длительность хранения		
	5°C (6 месяцев)	25°C (6 месяцев)	40°C (3 месяца)
HPSEC (% потери мономеров в месяц)	0,05	0,4	2,3
HPSEC (% агрегации в месяц)	0,05	0,3	1,6
HPSEC (% фрагментации в месяц)	0,00	0,1	0,7
Визуальная проверка (частиц)	Станд. 1	Станд. 1	<Станд. 2
Визуальная проверка (прозрачности)	<Станд. 2	<Станд. 2	<Станд. 2
Визуальная проверка (цвета)	Y6	Y5	Y3
В восстанавливающих условиях BioA (% тяжелая + легкая цепь + направляющий)	99,6	98,4	98,7

пик тяжелой цепи)			
BioA в невосстанавливающих условиях (% интактного IgG)	99,6	97,6	93,5
SVP (≥ 10 мкм частиц/мл)	73	33	13
SVP (≥ 25 мкм частиц/мл)	0	7	0
iCE (диапазон pI)	8,3 – 8,84	8,22 – 8,81	8,17 – 8,84
iCE (№ пиков)	4	5 (4 при T=3 мин.)	6

ПРИМЕР 8

Идентификация N-связанного олигосахарида

Fc-область дурвалумаба содержит цепь N-связанного олигосахарида, присоединенную к одиночному сайту на тяжелой цепи в Asn-301. Характеристика структуры олигосахаридов на дурвалумабе важна для понимания структурной микрогетерогенности продукта. Для контроля качества также важно, если способ изменяется.

Характеризовали олигосахариды отщепленные от дурвалумаба, который были представлен в профиле N-связанных олигосахаридов, меченных с помощью 2-AB, посредством ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (UPLC), в том числе малораспространенные гликоформы. Расщепление меченых с помощью 2-AB олигосахаридов с помощью экзо-гликозидаз, как описано в таблице 15, проводили для подтверждения невосстанавливающих концевых остатков моносахаридов. Определение профиля олигосахаридов завершали, как показано в таблице 16. Анализ LC/MS применяли для подтверждения молекулярной массы.

Таблица 15. Получение образца для расщепления олигосахарида дурвалумаба

Реагенты	Ферменты					
	Конт роль	Фукози даза	Сиалид аза А	Манноз идаза	β -Галакт озидаза	β --N-Ацетилгексо заминидаза
Гликаны дурвалумаба, меченные с помощью 2-AB (мкл)	16	16	16	16	16	16
Реакционный буфер (мкл)	4	4	4	4	4	4
Экзо-гликозидаза (мкл)	0	4	2	2	2	2
Вода (мкл)	2	0	0	0	0	0
Общий объем (мкл)	22	24	22	22	22	22

Таблица 16. Градиент в отношении профиля олигосахарида UPLC

Время	% А	% В
Исходное	27	73
23	41	59
23,1	100	0
27,5	100	0
27,6	27	73
30	27	73

Идентифицировали N-связанные олигосахариды в дурвалумабе, которые определяли как значительные пики в UPLC, и результаты показаны на фиг. 12. Преобладающие гликоформы дурвалумаба являются фукозилированными двухантенными олигосахаридами комплексного типа либо без концевых остатков галактозы (G0f), либо с моногалактозилированными (G1f) и дигалактозилированными (G2f) формами. Редкие комплексные гликоформы представляли собой афукозилированные G0 и G1, усеченные G0f и G0 формы без N-ацетил-глюкозамина (GlcNAc), сиалированные G1f и G2f формы (G1f+NAc, G2f+NAc или G2f+2NAc) и разделяющие структуры G0fb и G1fb. В зависимости от зрелости клетки яичника китайского хомячка (CHO), когда отбирали IgG,

также присутствовали гликоформы с высоким содержанием маннозы (Man4, Man5, Man6, Man7 и Man8).

Следует понимать, что вышеуказанное изобретение подчеркивает определенные конкретные варианты осуществления настоящего изобретения и что все модификации или альтернативные им эквиваленты находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения и соответствуют изложенному в прилагаемой формуле изобретения.

ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSLPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 2 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS RYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK YYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 3 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность CDR1 VH	GFTFSRYWMS
SEQ ID NO: 4 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность CDR2 VH	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 5 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность CDR3 VH	EGGWFGELAFDY
SEQ ID NO: 6 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность CDR1 VL	RASQRVSSSYLA
SEQ ID NO: 7 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность CDR2 VL	DASSRAT
SEQ ID NO: 8 mAb к PD-L1 человека (дурвалумаб) – полипептидная последовательность CDR3 VL	QQYGSLPWT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав на основе антитела, содержащий:
 - (a) от 40 мг/мл до 50 мг/мл антитела к PD-L1;
 - (b) от 15 мМ до 35 мМ буфера;
 - (c) от 255 мМ до 275 мМ дисахарида; и
 - (d) от 0,01% (вес/об.) до 0,05% (вес/об.) поверхностно-активного вещества; игде pH состава составляет от pH 5,5 до pH 7,2.
2. Состав на основе антитела по п. 1, где антитело к PD-L1 содержит:
 - (a) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2; или
 - (b) CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.
3. Состав на основе антитела по п. 1, где буфер представляет собой буфер гистидин/гистидин-HCl.
4. Состав на основе антитела по п. 1, где дисахарид представляет собой дигидрат трегалозы.
5. Состав на основе антитела по п. 1, где дисахарид представляет собой сахарозу.
6. Состав на основе антитела по п. 1, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.
7. Состав на основе антитела по любому из пп. 1-6, где состав представляет собой жидкий состав, замороженный состав, лиофилизированный состав или восстановленный состав.
8. Состав на основе антитела по п. 1, где менее приблизительно 1% антител к PD-L1 образуют агрегат при хранении при 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SPEC).

9. Состав на основе антитела по п. 1, где по меньшей мере 97% антител к PD-L1 представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC).

10. Состав на основе антитела по п. 1, где по меньшей мере 99% антител к PD-L1 представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC).

11. Состав на основе антитела по п. 1, где по меньшей мере 98% антител к PD-L1 представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 5° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC).

12. Состав на основе антитела по п. 1, где стабильность состава на основе антитела сохраняется после по меньшей мере трех циклов замораживания/размораживания.

13. Состав на основе антитела, содержащий:

- (a) 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека;
- (b) 26 mM буфера гистидин/гистидин-HCl;
- (c) 275 mM дигидрата трегалозы; и
- (d) 0,02% (вес/об.) полисорбата 80; и

где pH состава составляет pH 6,0.

14. Состав на основе антитела, содержащий:

- (a) 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека;
- (b) 25 mM буфера гистидин/гистидин-HCl;
- (c) 265 mM дигидрата трегалозы; и
- (d) 0,02% (вес/об.) полисорбата 80; и

где pH состава составляет pH 5,5.

15. Состав на основе антитела, содержащий:

- (a) 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека;
- (b) 25 mM буфера гистидин/гистидин-HCl;
- (c) 265 mM дигидрата трегалозы; и
- (d) 0,02% (вес/об.) полисорбата 80; и

где pH состава составляет pH 6,5.

16. Состав на основе антитела, содержащий:

- (a) 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека;
- (b) 25 mM буфера гистидин/гистидин-HCl;
- (c) 265 mM дигидрата трегалозы; и
- (d) 0,04% (вес/об.) полисорбата 80; и

где pH состава составляет pH 6,0.

17. Состав на основе антитела, содержащий:

- (a) 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека;
- (b) 25 mM буфера гистидин/гистидин-HCl;
- (c) 265 mM сахарозы; и
- (d) 0,02% (вес/об.) полисорбата 80; и

где pH состава составляет pH 6,0.

18. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где антитело к PD-L1 человека содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

19. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где антитело к PD-L1 человека содержит:

CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и
 CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и
 CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и
 CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
 CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

20. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где состав представляет собой жидкий состав, замороженный состав, лиофилизированный состав или восстановленный состав.

21. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где менее приблизительно 1% антител к PD-L1 человека образуют агрегат при хранении при 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как определено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SPEC).

22. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где по меньшей мере 97% антител к PD-L1 человека представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC).

23. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где по меньшей мере 99% антител к PD-L1 человека представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 40° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SEC).

24. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где по меньшей мере 98% антител к PD-L1 человека представлены в виде мономеров после хранения при приблизительно 5° Цельсия в течение приблизительно 1 месяца, как измерено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HPSEC).

25. Состав на основе антитела по любому из пп. 13-17, где стабильность состава на основе антитела сохраняется после по меньшей мере трех циклов замораживания/размораживания.

26. Композиция, предусматривающая:

(a) антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; и

(b) главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF) в отношении композиции.

27. Композиция, предусматривающая:

(a) антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2;

(b) главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции; и

(c) кислотные формы антитела, составляющие от 45% до 50% белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции.

28. Композиция, предусматривающая:

(a) антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную

последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2;

(b) главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции; и

(c) основную форму антитела, составляющую от 18% до 23% белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции.

29. Композиция, предусматривающая:

(a) антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2;

(b) главную форму антитела, составляющую 45% или больше белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции;

(c) кислотные формы антитела, составляющие от 45% до 50% белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции; и

(d) основную форму антитела, составляющую от 18% до 23% белка в композиции, как измерено с применением cIEF в отношении композиции.

30. Композиция, предусматривающая:

(a) антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2; и

(b) гликановые структуры антитела к PD-L1, которые предусматривают гликоформы G0f, G1f, G2f и G0.

31. Композиция по п. 30, где гликановые структуры антитела к PD-L1 характеризуются содержанием гликоформ G0f, G1f, G2f и G0, составляющим более 90%.

32. Композиция по п. 30, где антитело к PD-L1 характеризуется содержанием G0f, составляющим 71,9%, содержанием G1f, составляющим 18,4%, содержанием G2f, составляющим 1,5%, и содержанием G0, составляющим 1,9%.

33. Композиция, предусматривающая:

(a) антитело к PD-L1, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной

последовательности под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2;

(b) от 1,5% до 2,5% антител к PD-L1, образующих агрегат, как определено посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HP-SPEC); и

(c) от 97% до 98% антител к PD-L1, представленных в виде мономеров, как измерено посредством HP-SEC.

34. Композиция по любому из пп. 26-33, где антитело к PD-L1 содержит:

CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и

CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и

CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и

CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и

CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и

CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

35. Состав на основе антитела, содержащий:

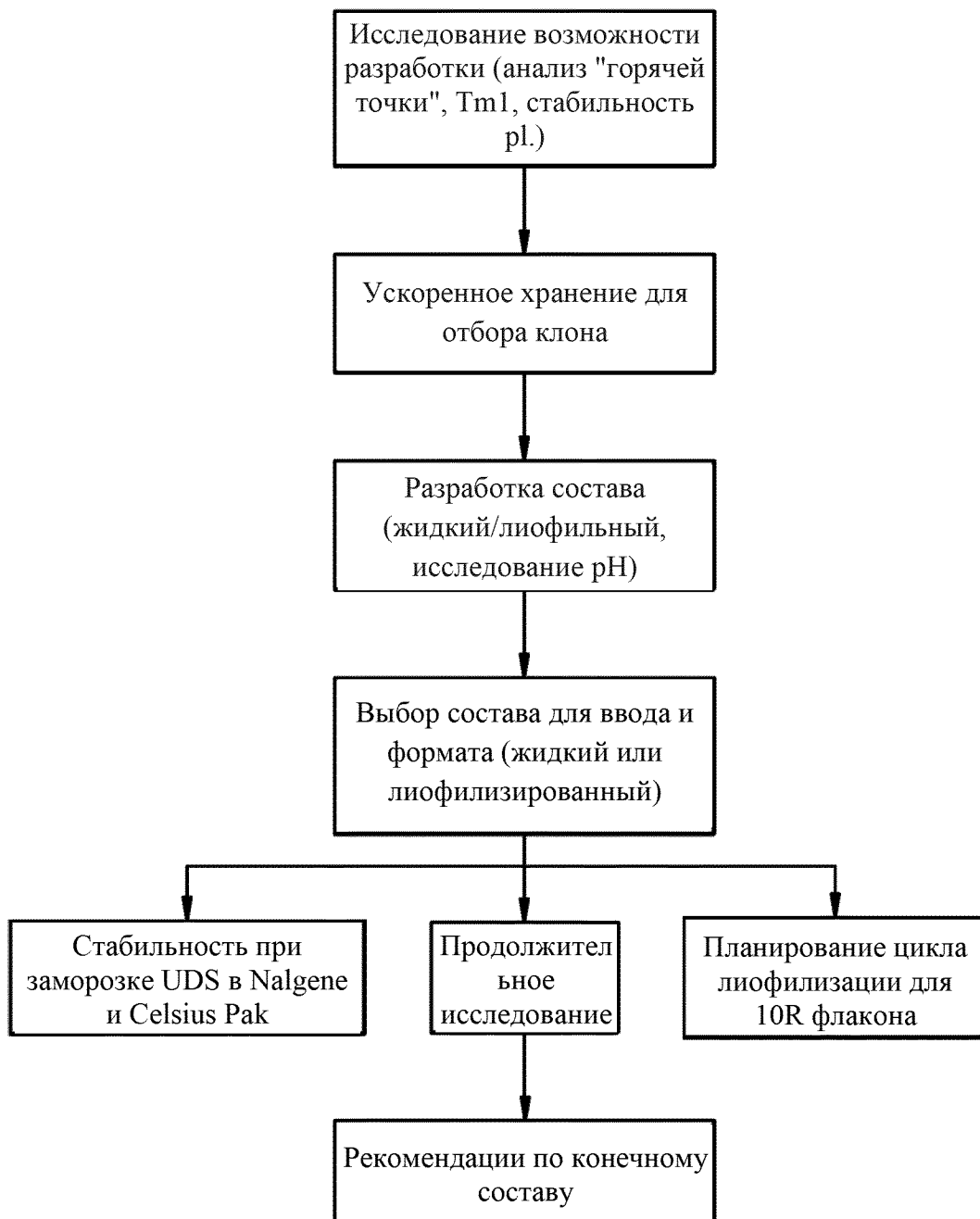
(a) 50 мг/мл антитела к PD-L1 человека;

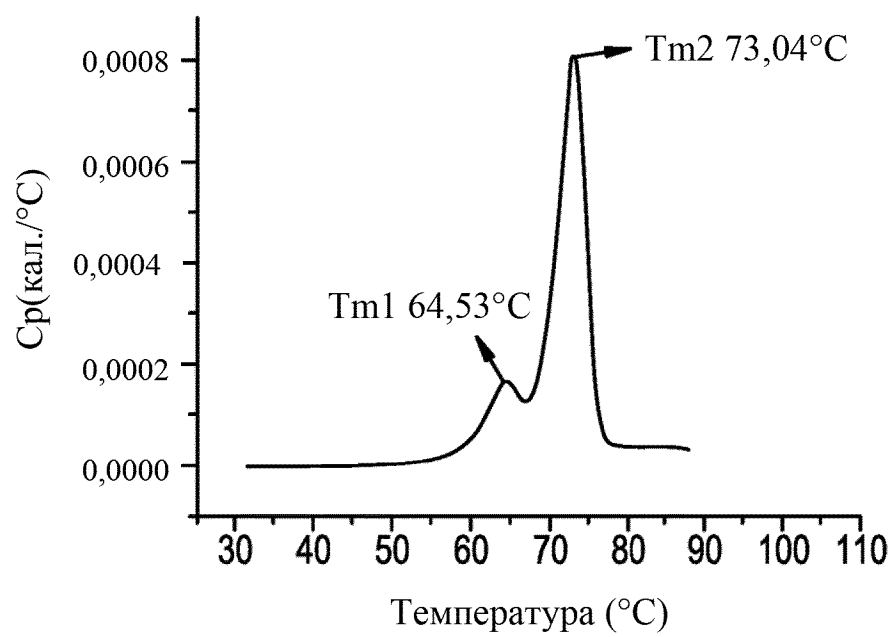
(b) 26 mM буфера гистидин/гистидин-HCl;

(c) 275 mM дигидрата трегалозы; и

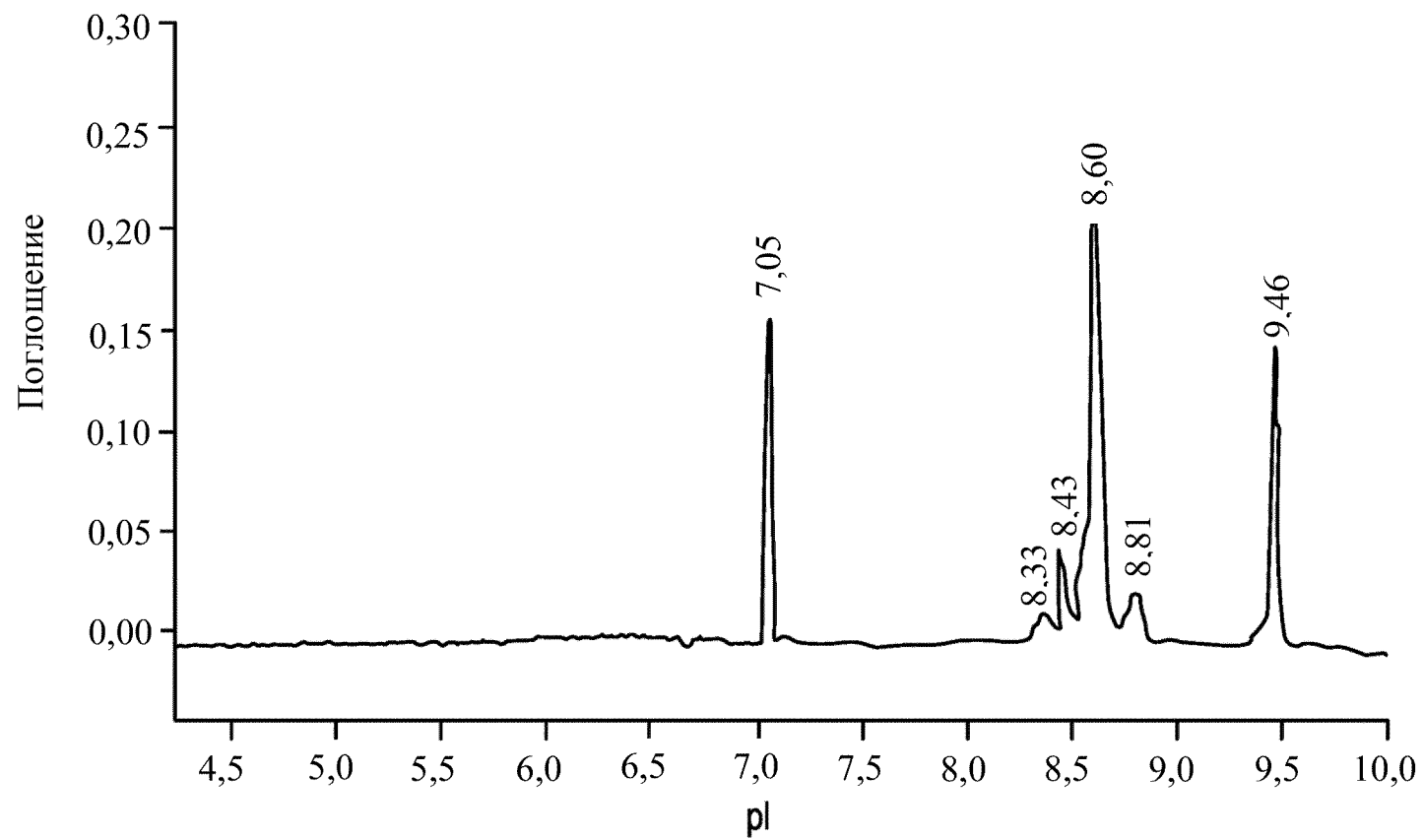
(d) 0,02% (вес/об.) полисорбата 80; и

где pH состава составляет pH 6,0, и где антитело к PD-L1 человека содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

Фиг. 1

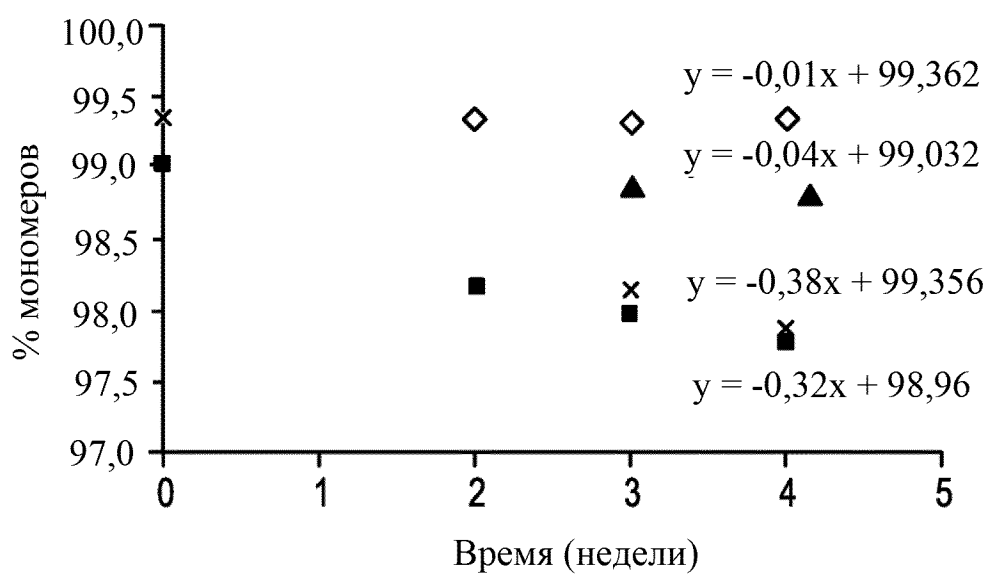
Фиг. 2

Фиг. 3



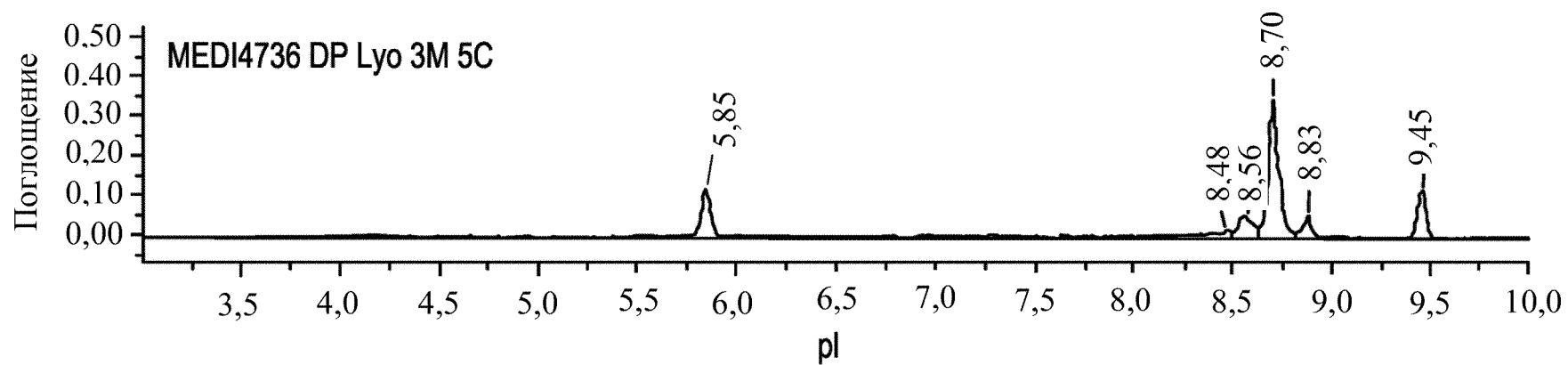
Фиг. 4

Сравнение клона MEDI4736 при ускоренном
испытании стабильности: чистота мономера (%)
согласно HP-SEC

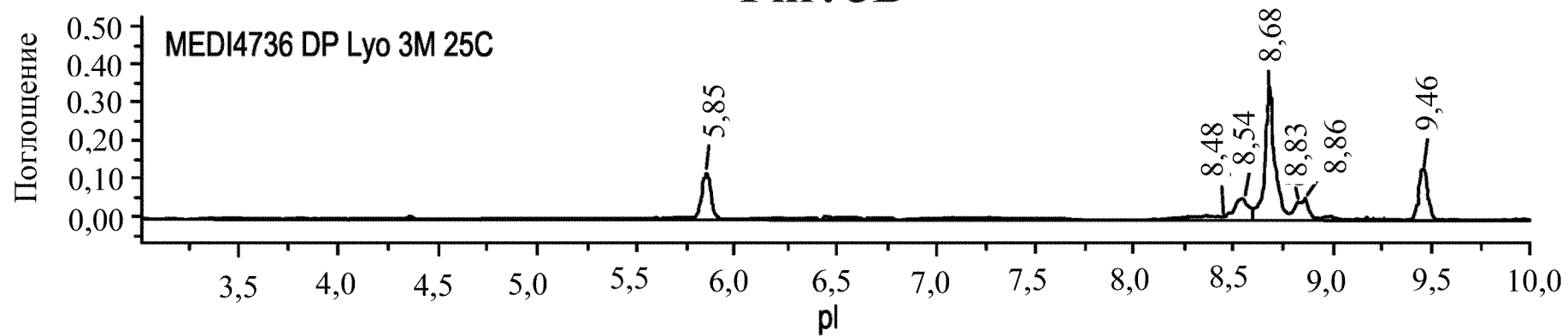


◆ Клон 1, 5°C × Клон 1, 40°C ▲ Клон 2, 5°C ■ Клон 2, 40°C

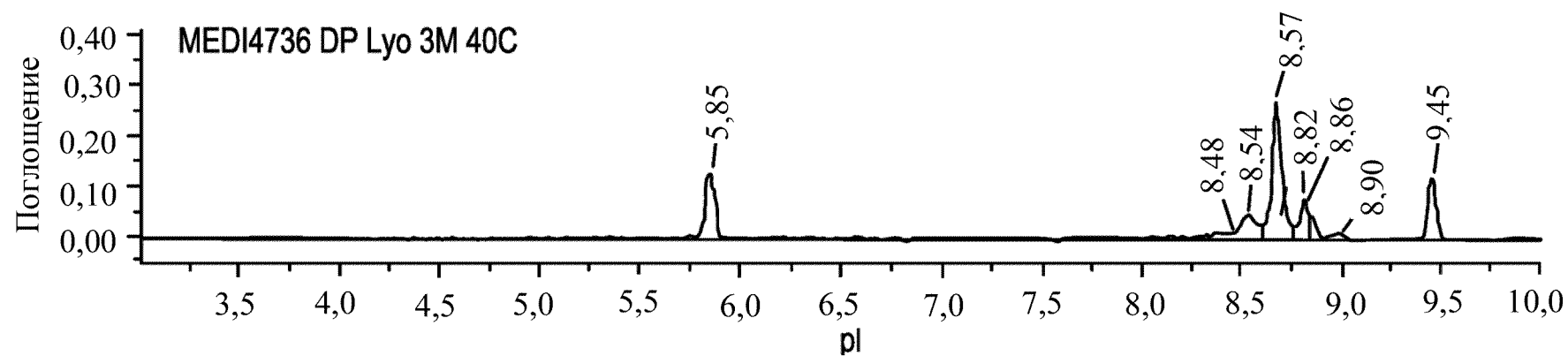
Фиг. 5А

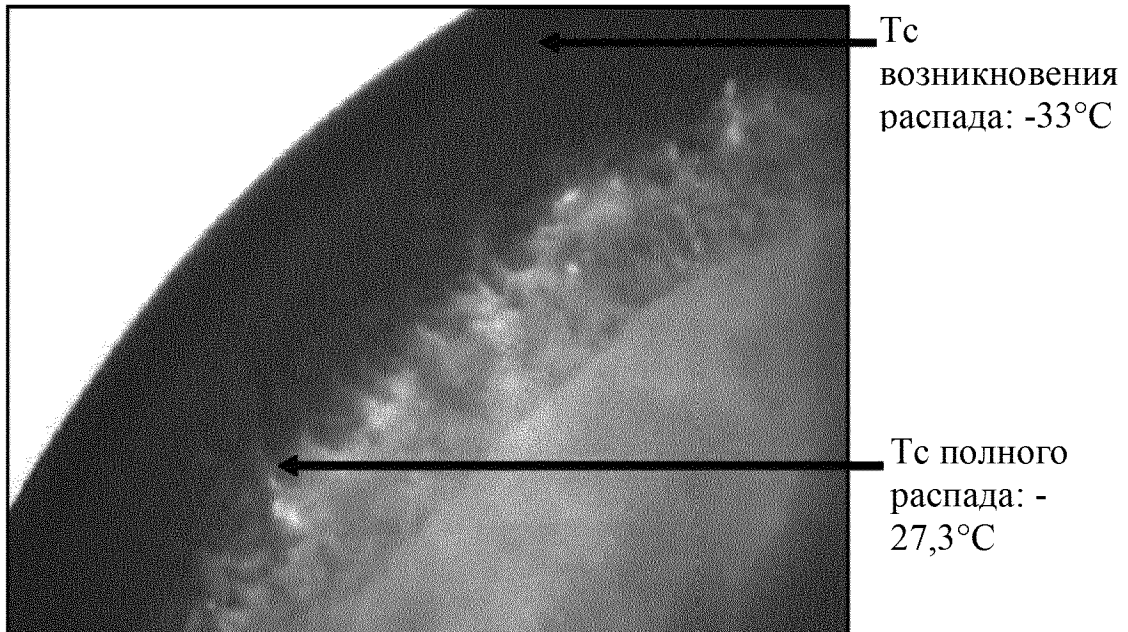


Фиг. 5В

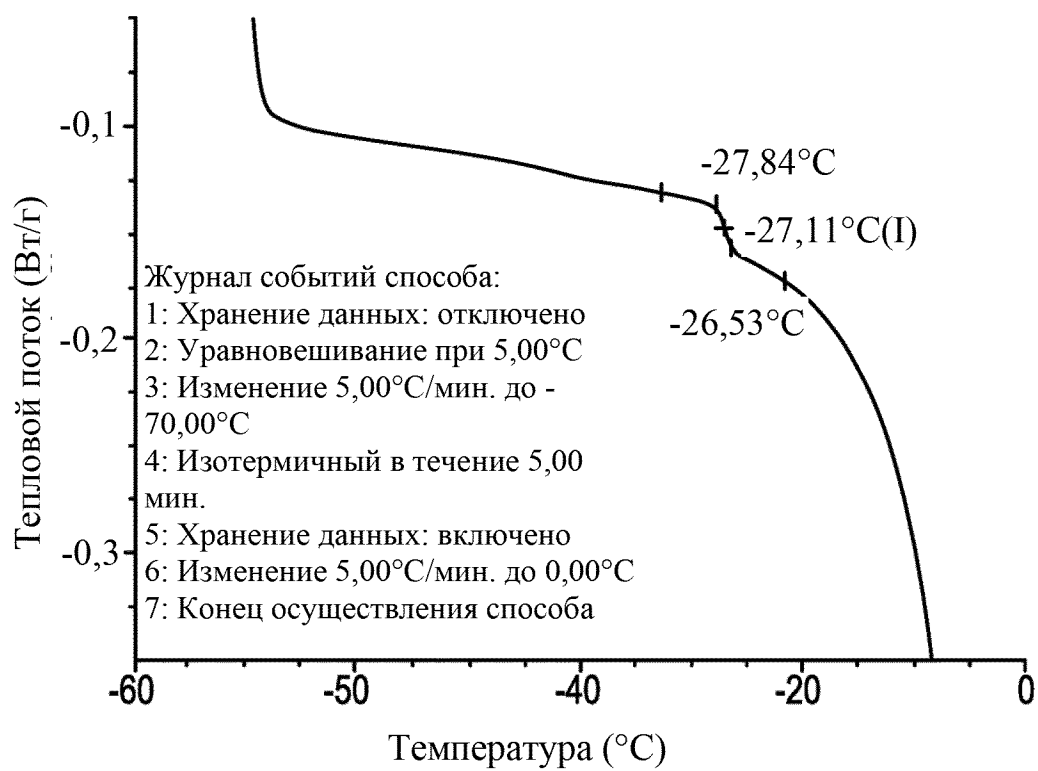


Фиг. 5С



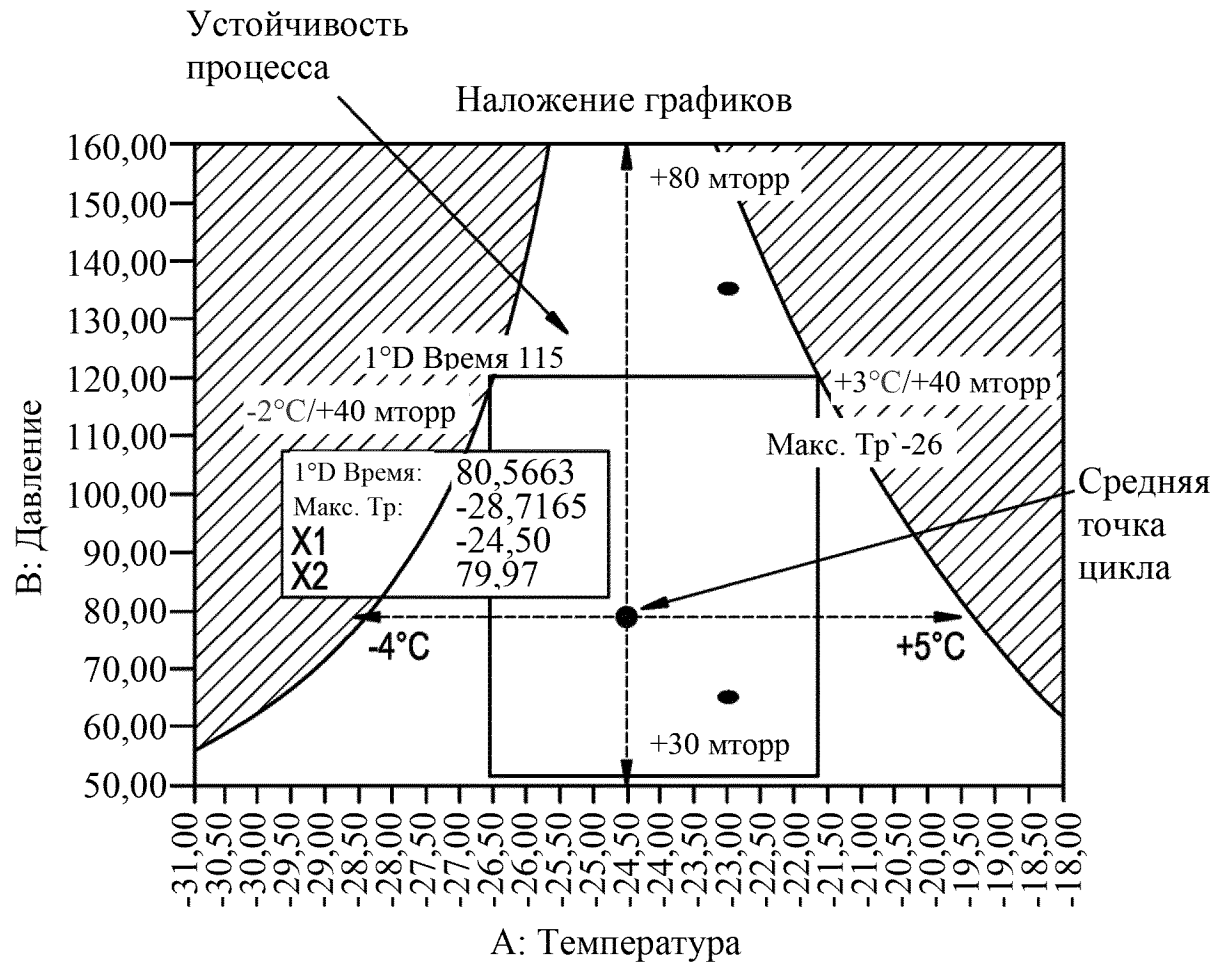
Фиг. 6

Фиг. 7

Возрастающий экзотермический
эффект

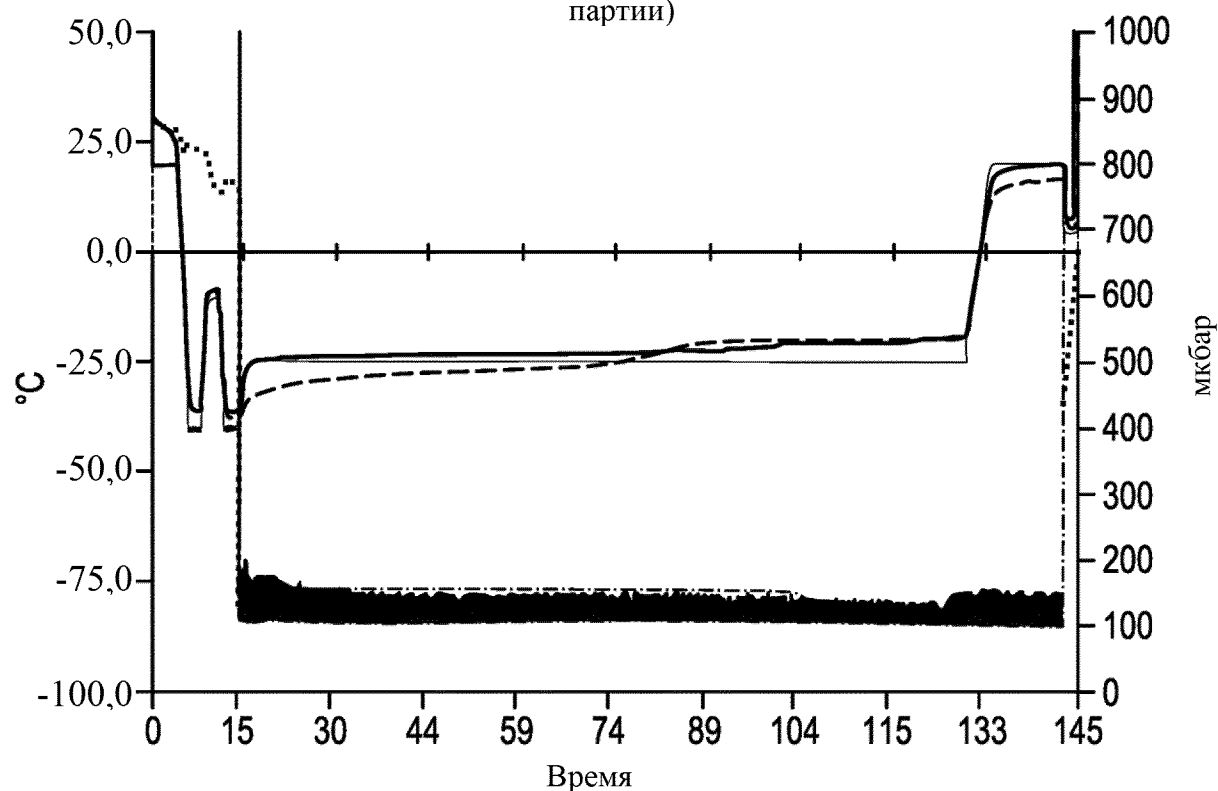
Унифицированный V4 5A TA

Фиг. 8

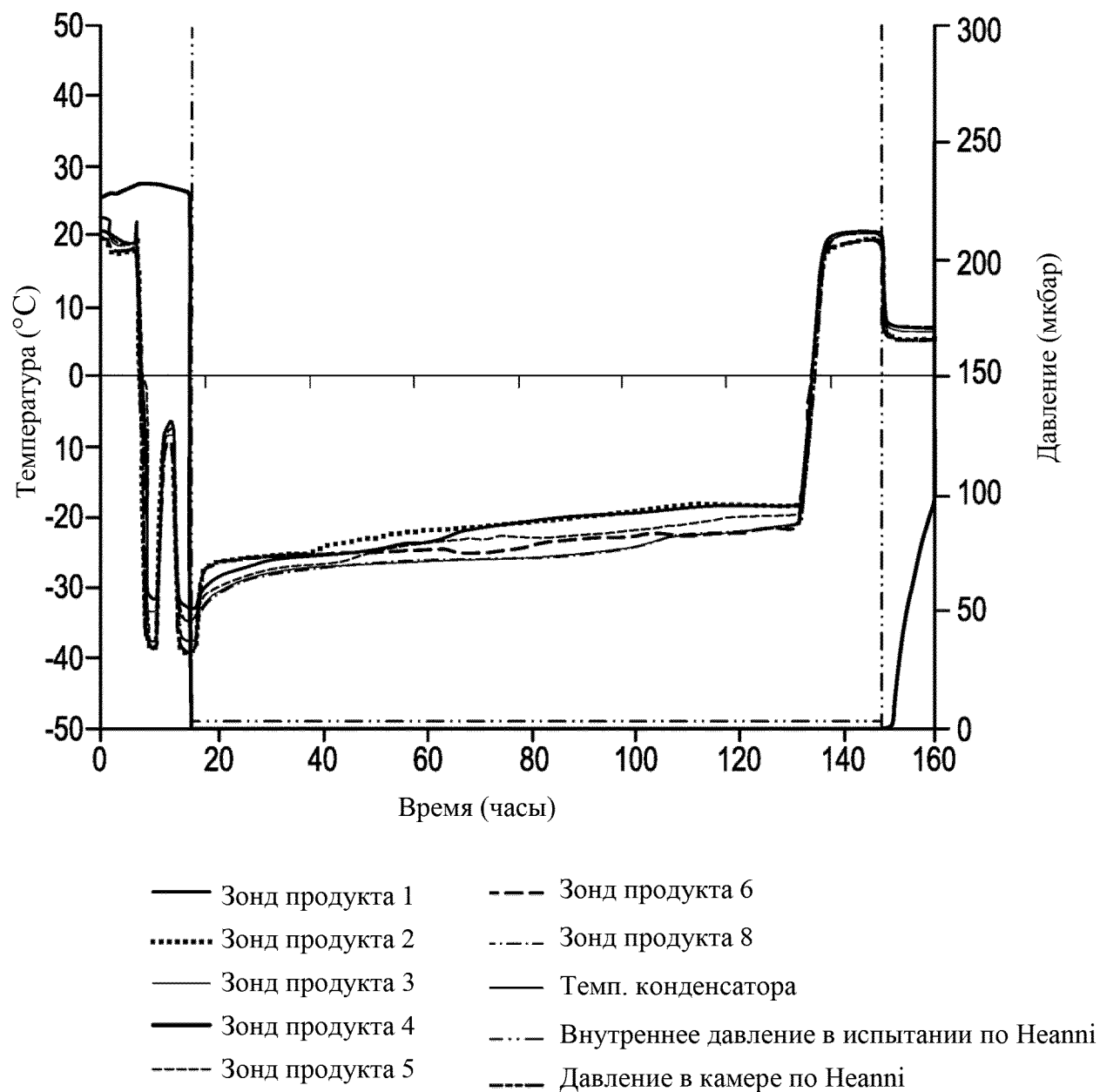


Фиг. 9

Лот № BF0093, Edwards, 2448 флаконов загружены в
лиофилизатор (данные из протокола сопровождения
партии)



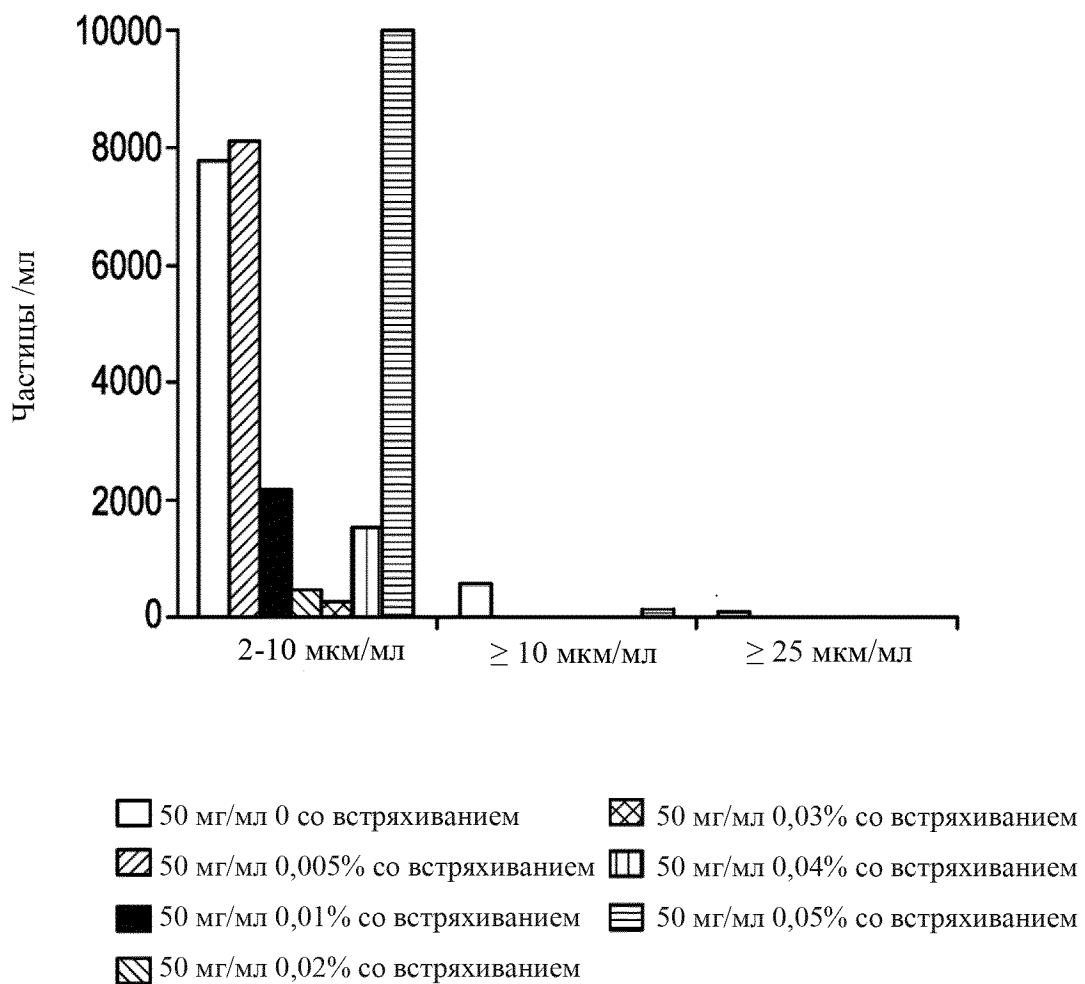
-----	Заданное значение изменения температуры текучей среды, проходящей через впускное отверстие полки	————	TE104 Зонд на основе продукта №4 (°C)
————	TE201, температура текучей среды, проходящей через впускное отверстие полки (°C)	—*—	PT101 Вакуум в камере MKS (мкбар)
.....	TE203, температура конденсационного змеевика 1 (°C)	-.-.-.-	PT102 Вакуум в камере согласно вакуумметру Пирани (мкбар)
-.-.-.-	TE102 Зонд на основе продукта №2 (°C)	————	Объект: FD1: Название партии: BF0093Lyо; Название препарата: MEDI4736

Фиг. 10Флаконы AMSCO19168 от 13 августа BL0073 Lyo
с MEDI4736

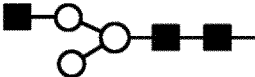
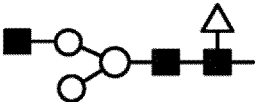
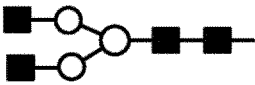
Фиг. 11

Результаты исследования MFI со
встряхиванием в отношении MEDI4736

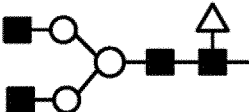
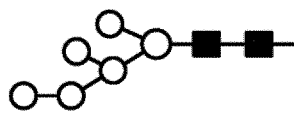
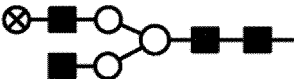
Частицы/мл



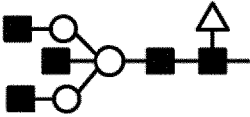
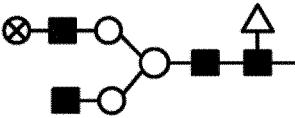
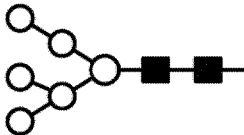
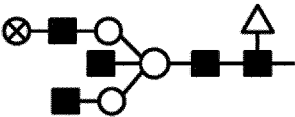
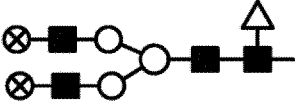
Фиг. 12

Пик №	К. т. (мин.)	Содержание (%)	ID	Структура гликана	Перекрестная ссылка на результаты хроматографических анализов
1	5,4	0,3	G0-GN		Увеличение в результате обработки фукозидазой в связи с изменением G0f-GN в этих видах. Превращение в M3 в результате расщепления гексозаминидазой.
2	6,0	Не определено	Пик системы	Не определено	Пик не подвергался влиянию любой из пяти экзогликозидаз. Пик исчезает в результате промывания образца олигосахарида с помощью 96% CH ₃ CN.
3	6,4	1,1	G0f-GN		Исчезновение в результате расщепления фукозидазой и гексозаминидазой
4	6,7	1,9	G0		Повышение при обработке фукозидазой вследствие превращения G0f в этом входе. Исчезновение в результате расщепления гексозаминидазой и влияние на повышение M3
5	7,1	0,1	M4		Исчезновение в результате расщепления маннозидазой

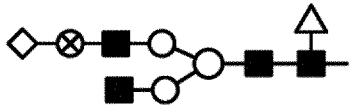
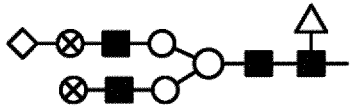
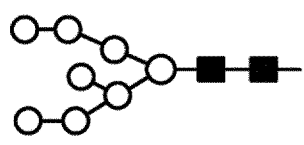
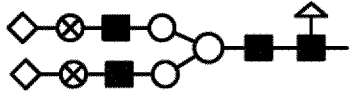
Фиг. 12 (продолжение)

Пик №	К. т. (мин.)	Содержание (%)	ID	Структура гликана	Перекрестная ссылка на результаты хроматографических анализов
6	7,4	0,1-0,2	G0f-H ₂ O	G0f-H ₂ O	Подтверждение на основании LC/MS, молекулярная масса составляла 18, ниже чем G0F (DEV4736_GB_0173 ED 001)
7	7,7	71,9	G0f		Исчезновение в результате обработки фукозидазой и воздействие на повышение G0 Исчезновение в результате расщепления гексозаминидазой и воздействие на повышение M3f. Без изменений с сиалидазой или маннозидазой
8	8,5	1,0	M5		Исчезновение в результате обработки маннозидазой
9	8,7	0,3	G1		Типичная двойная G1α(1,6) и G1fa(1,3). Исчезновение в результате обработки β-галактозидазой и воздействие на повышение G0. Исчезновение в результате обработки гексозаминидазой и воздействие на повышение G1-GN
10	9,0	0,1			

Фиг. 12 (продолжение)

Пик №	К. т. (мин.)	Содержание (%)	ID	Структура гликана	Перекрестная ссылка на результаты хроматографических анализов
11	9,6	0,4	G0fb		От G0b с фукозидазой Повышение при расщеплении β-галактозидазой в связи с превращением G1fb в эту частицу
12	9,8	13,8	G1f		Типичная двойня G1fa(1,6) и G1fa(1,3). Измененная в G1 с помощью фукозидазы. Исчезновение в результате расщепления β-галактозидазой, чтобы стать G0f
13	10,1	4,6			
14	11,0	0,2	M6		Исчезновение в результате обработки маннозидазой
15	11,8	0,3	G1fb		Исчезновение в результате обработки фукозидазой и β-галактозидазой
16	12,3	1,5	G2f		Исчезновение вследствие обработки фукозидазой и β-галактозидазой

Фиг. 12 (продолжение)

Пик №	К. т. (мин.)	Содержание (%)	ID	Структура гликана	Перекрестная ссылка на результаты хроматографических анализов
17	12,7	0,5	G1f+N Ac		Исчезновение вследствие расщепления сиалидазой или гексозаминидазой
18	14,6	0,4	G2f+N Ac		Исчезновение вследствие расщепления сиалидазой или β-галактозидазой
19	15,7	0,2	M8		Исчезновение в результате обработки маннозидазой
20	17,0	0,3	G2f+2 NAc		Исчезновение в результате расщепления фукозидазой и сиалидазой. Без изменений с β-галактозидазой