

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040788**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.07.27**
- (21) Номер заявки  
**201691883**
- (22) Дата подачи заявки  
**2015.05.04**
- (51) Int. Cl. *A61K 47/10* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 47/18* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 47/26* (2006.01)

---

(54) **ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СОЕДИНЕНИЕ, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ GM-CSF**

---

- (31) 14167405.1; 61/994,319; 62/043,636  
(32) 2014.05.07; 2014.05.16; 2014.08.29  
(33) EP; US; US  
(43) 2017.05.31  
(86) PCT/EP2015/059709  
(87) WO 2015/169742 2015.11.12  
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**
- (72) Изобретатель:  
**Дилузио Уиллоу, Нгуйен Фун (US)**
- (74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В. (RU)**
- (56) EP-A1-1947178  
US-A1-2001014326  
WO-A2-2009038760

- 
- (57) Изобретение относится к водным композициям, содержащим соединение, нейтрализующее GM-CSF, в концентрации от 50 до 200 мг/мл, регулятор тоничности, буфер и одно или более поверхностно-активных веществ, где pH составляет от 5 до 7, и композиция является стабильной. Композиция предназначена для применения в лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

**B1**

**040788**

**040788**

**B1**

Настоящее изобретение относится к стабильным жидким композициям, содержащим соединение, нейтрализующее гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Ингредиенты композиции предпочтительно обеспечивают стабильность в течение длительного хранения и циклов замораживания-размораживания. В предпочтительном аспекте эти композиции предназначены для применения в терапии, предпочтительно для применения в лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний, предпочтительно включая аллергические и псориатические расстройства, а также артриты и астматические расстройства. Кроме того, предложен набор, содержащий композиции по изобретению.

Белки имеют широкий диапазон применений в области фармацевтики, ветеринарных препаратов, косметических средств и других потребительских товаров, продуктов питания, кормов, диагностики, промышленной химии и дезинфекции. Иногда такие применения ограничены ограничениями, присущими самим белкам или накладываемыми окружающей средой или средой, в которой их применяют. Такие ограничения могут привести к плохой стабильности белков, изменчивости их характеристик или высокой стоимости. В связи с появлением биотехнологии можно получать широкий спектр белков для терапевтических применений. После их получения белковые фармацевтические препараты обычно хранят перед их применением. В связи с тем, что белки, как правило, больше и сложнее "традиционных" фармацевтических препаратов, составление композиций и обработка белковых лекарственных средств, пригодных для хранения, могут быть особенно сложными. Обзоры схем составления белковой фармацевтической композиции и обработки см. в Carpenter et al. (1997), *Pharm. Res.* 14:969-975; Wang (2000), *Int. J. Pharmaceutics*, 203:1-60; и Tang and Pikal (2004), *Pharm. Res.* 21:191-200.

Несколько факторов можно учитывать при разработке композиций и способов получения белкового фармацевтического препарата. Особую важность представляет стабильность белка на всех этапах изготовления, транспортировки и обработки, которые могут включать получение композиции, замораживание, лиофилизацию, сушку, хранение, транспортировку, разведение, циклы замораживания/размораживания и хранение после разведения конечным пользователем. Другие возможные соображения включают простоту и экономичность изготовления, обработки и распределения; состав конечного продукта для введения пациенту и простоту применения конечным пользователем, включая растворимость лиофилизированного препарата при разведении.

Жидкие композиции могут соответствовать определенным задачам. Возможные преимущества жидких композиций включают простоту и экономичность изготовления, а также удобство для конечного потребителя. Часто при хранении в течение длительного времени полипептиды являются неустойчивыми в растворе (Manning et al. (1989), *Pharm. Res.* 6:903-918). Соответственно, были разработаны дополнительные стадии обработки, чтобы обеспечить более длительный срок хранения, включая сушку, например лиофилизацию. Лيوфилизированные композиции могут также обеспечивать определенные преимущества. Возможные преимущества лиофилизации включают улучшенную стабильность белка, а также простоту и экономичность транспортировки и хранения. Однако лиофилизированные фармацевтические композиции могут быть менее удобны для конечного пользователя.

В дополнение к выбору основной формы композиции (например, лиофилизированной, жидкой, замороженной и т.д.), оптимизация белковой композиции, как правило, включает варьирование компонентов композиции и их соответствующих концентраций для максимизации стабильности белка. Различные факторы могут влиять на стабильность белка, включая ионную силу, pH, температуру, циклы замораживания/размораживания, силы сдвига, замораживание, лиофилизацию, сушку, перемешивание и разведение. Нестабильность белка может быть вызвана физической деградацией (например, денатурацией, агрегацией или осаждением) или химической деградацией (например, дезамидированием, окислением или гидролизом).

Оптимизация компонентов композиции и концентрации основана исключительно на эмпирических исследованиях и/или рациональных подходах к преодолению источников нестабильности.

Иногда при длительном хранении фармацевтических композиций, содержащих полипептиды, в том числе водных и лиофилизированных композиций, активные полипептиды могут быть потеряны из-за агрегации и/или деградации.

Соответственно, типичными способами улучшения стабильности полипептида могут являться изменение концентрации элементов в композиции или добавление вспомогательных веществ для модификации композиции (патенты US 5580856 и 6171586 и патентные заявки US 2003/0202972, 2003/0180287). US 5580856 представляет собой патент-прототип, раскрывающий агенты, такие как природные полимеры, поверхностно-активные вещества, сульфатированные полисахариды, белки и буферы, которые могут быть добавлены для стабилизации высушенного белка во время или после регидратации. Однако, помимо множества вариантов, патент US 5580856 не указывает, какой стабилизатор следует добавлять для какого белка. Соответственно, в то время как опытный читатель осведомлен об этих многих вариантах, он или она должны выяснить лучшие условия для его/ее белка среди многих вариантов, описанных в патенте US 5580856. В патентной заявке US 2003/0202972 описана стабильная лиофилизированная композиция анти-Her2 антитела, где стабилизатор представляет собой сахар, трегалозу или буфер. И все же, в то время как эти стабилизаторы могут быть полезными для антитела, они не могут быть экстраполированы на другие белки. Патентная заявка US 2003/0180287 аналогична патентной заявке US 2003/0202972

в том, что она также описывает стабильный раствор иммуноглобулин-подобного белка, т.е. белка, содержащего домен Fc. Стабилизатором может быть фосфат натрия, фосфат калия, цитрат натрия или калия, малеиновая кислота, ацетат аммония, Трис-буфер, ацетат, диэтаноламин, гистидин, лизин и цистеин. Среди этих химически различных стабилизаторов, которые могут быть выбраны опытным читателем, подходящим оказался лизин. Однако, как и в US 2003/0202972, конкретный стабилизатор просто подходит для конкретного белка, здесь Fc-домен-содержащего белка и не может сам по себе быть экстраполирован на другой белок. Соответственно, применение добавок не может быть экстраполировано от конкретного белка на другой неродственный белок. Действительно, применение добавок - при улучшении хранения - все еще может привести к неактивным полипептидам. Кроме того, в случае лиофилизации стадия регидратации может привести к условиям, которые приводят к инактивации полипептида, например, посредством агрегации или денатурации (Hora et al. (1992), *Pharm. Res.*, 9:33-36; Liu et al. (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37:177-184). Действительно, агрегация полипептидов нежелательна, так как она может привести к иммуногенности (Cleland et al. (1993), *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems*, 10:307-377; и Robbins et al. (1987), *Diabetes*, 36:838-845).

Сохранение биологической активности в процессе разработки и изготовления фармацевтических продуктов зависит от стабильности, присущей макромолекуле, а также от используемых методов стабилизации. Существует целый ряд методов стабилизации белка, включая добавление химических "стабилизаторов" к водному раствору или суспензии белка. Например, патент US 4297344 описывает стабилизацию факторов коагуляции II и VIII, антиромбина III и плазминогена против нагревания путем добавления выбранных аминокислот. Патент US 4783441 описывает способ стабилизации белков путем добавления поверхностно-активных веществ. Патент US 4812557 описывает способ стабилизации интерлейкина-2 с использованием человеческого сывороточного альбумина. Методы замораживания/размораживания, в которых препарат смешивают с криопротектором и хранят при очень низких температурах, являются еще одним вариантом стабилизации белка. Однако не все белки переносят цикл замораживания/размораживания. Хранение в холоде с добавленным криопротектором, как правило глицерином, является еще одним вариантом. Также может быть выполнено хранение в виде стекла, как описано в патенте US 5098893. В этом случае белки растворяют в водорастворимых или набухающих в воде веществах, находящихся в аморфном и стеклообразном состоянии. Наиболее широко используемый способ стабилизации белков представляет собой сушку вымораживанием или лиофилизацию. В случае, когда достаточная стабильность белка не может быть достигнута в водном растворе, лиофилизация обеспечивает наиболее приемлемую альтернативу. Одним недостатком лиофилизации является то, что она требует сложной обработки, отнимает много времени и является дорогой. Кроме того, если лиофилизация не выполнена тщательно, большая часть препарата по меньшей мере частично денатурирует на стадиях замораживания и сушки согласно этой методике. Результатом является часто необратимая агрегация части белковых молекул, что делает композицию неприемлемой для парентерального введения.

В целом, деградация белков хорошо описана в литературе, но хранение и растворимость соединений, нейтрализующих гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (далее называемый GM-CSF), в частности полипептидов и анти-GM-CSF антител, не описаны.

Кроме того, в то время как в данной области техники было известно, что имеется множество вариантов агентов, стабилизирующих белки, а также агентов, которые обеспечивают возможность создания высокой концентрации белка при сохранении стабильности, вплоть до настоящего изобретения в данной области не было признано, что композиция, содержащая соединения, нейтрализующие GM-CSF, в высоких концентрациях, может быть нестабильной и, следовательно, требует улучшения.

При приготовлении фармацевтической композиции, содержащей белок, такой как антитело, например моноклональное антитело, целью является разработка высококонцентрированных жидких композиций из-за возможного подкожного введения, что создает большее удобство для пациента. Однако существует общее мнение, что разработка высококонцентрированных композиций антител, в частности моноклональных антител, представляет серьезные проблемы в отношении физической и химической стабильности моноклональных антител, такие как повышенное образование растворимых, а также нерастворимых, агрегатов или частиц, которые повышают вероятность иммунного ответа, а также приводят к низкой биологической активности.

Образование агрегатов или частиц полипептидами при хранении жидкой фармацевтической композиции может негативно влиять на биологическую активность этого полипептида, что приводит к потере терапевтической эффективности фармацевтической композиции. Кроме того, образование агрегатов или частиц может вызывать другие проблемы, такие как закупорка труб, мембран или насосов, когда полипептид-содержащую фармацевтическую композицию вводят, используя инфузионную систему.

Кроме того, сообщалось, что высококонцентрированные композиции антител обладают повышенной вязкостью, тем самым создавая серьезные проблемы в изготовлении и введении. Высоковязкие композиции трудно изготовить, втянуть в шприц и инъектировать. Применение силы при манипулировании вязкими композициями приводит к избыточному пенообразованию, что может вызвать денатурацию и инактивацию активных моноклональных антител.

Таким образом, существует большая потребность в стабильной высококонцентрированной белко-

вой фармацевтической композиции, содержащей соединение, нейтрализующее GM-CSF, например анти-тело, и имеющей низкую и подходящую вязкость, которая подходит для подкожного введения, например, в готовом для использования устройстве. Кроме того, с точки зрения пациента было бы очень желательно иметь продукты, стабильные при комнатной температуре. На данный момент нет представленных на рынке композиций антител, хранение которых при комнатной температуре возможно в течение срока годности этого лекарственного продукта. Как правило, происходит повышенная агрегация белка, вызывающая недопустимо высокий уровень агрегатов и белковых примесей, которые могут привести к возникновению иммуногенных реакций.

Недавно было показано, что гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), первоначально идентифицированный как гемопозитический фактор роста, является важным цитокином при воспалении и аутоиммунной реакции. Повышенные уровни мРНК или белка GM-CSF наблюдаются в разных местах воспаления, включая пациентов, страдающих аллергией и псориазом, артритом и астмой. За последние несколько лет многочисленные исследования *in vivo* показали, что блокада GM-CSF с помощью нейтрализующих антител может предупредить или даже вылечить провоспалительные заболевания в различных моделях воспаления, включая модели артрита, экспериментального аутоиммунного энцефалита, псориаза и заболевания легких. Таким образом, очень желательно иметь доступную композицию с соединением, нейтрализующим GM-CSF, которая является, в частности, стабильной, содержит большие количества соединения, нейтрализующего GM-CSF, и/или может быть введена подкожным путем.

Следовательно, техническая задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы удовлетворить потребности, описанные выше.

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей и, таким образом, обеспечивает в качестве решения технической задачи воплощения, касающиеся композиций, а также способов и применений этих композиций при лечении субъектов, страдающих заболеваниями, для лечения которых полезно введение соединений, нейтрализующих GM-CSF. Эти воплощения охарактеризованы и описаны здесь, проиллюстрированы в разделе "Примеры" и отражены в формуле изобретения.

Следует отметить, что используемые здесь формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если в контексте ясно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "антитело" включает одно или более таких разных антител, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные специалистам в данной области, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными здесь.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу этого ряда. Специалистам в данной области понятно или они способны установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, множество эквивалентов для конкретных воплощений изобретения, описанного здесь. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены настоящим изобретением.

В данном описании изобретения и формуле изобретения, которая следует ниже, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как означающие включение указанного целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий. При использовании в данном описании термин "содержащий" может быть заменен термином "вещающий" или иногда при использовании в данном описании термином "имеющий" или даже может быть заменен термином "состоящий из".

При использовании здесь термин "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в заявленном элементе. При использовании в данном описании "по существу состоящий из" не исключает вещества или стадии, которые не оказывают фактического влияния на основные и новые характеристики заявленного. В каждом случае в данном описании термины "по существу состоящий из" и "состоящий из" могут заменять друг друга.

Используемый в данном описании союз "и/или" между несколькими перечисленными элементами понимают как охватывающий и отдельные, и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены с помощью "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Очевидно, что любой из этих вариантов подпадает под указанное значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или", использованного здесь. Одновременная применимость более чем одного варианта также подразумевается как подпадающая в объем этого значения и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или", использованного здесь.

Некоторые документы упоминаются в тексте данного описания. Каждый из документов, указанных в настоящем документе (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации изготовителя, инструкции и т.д.) как выше, так и ниже, включены в данное описание изобретения в качестве ссылки во всей их полноте. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не согласуется с данным описанием, описание заменяет любой такой материал. Ничто

в данном описании изобретения не следует истолковывать как допущение того, что данное изобретение не имеет права датировать задним числом такое раскрытие на основании предшествующего изобретения.

Считая целью предложение композиции с высокой концентрацией соединений, нейтрализующих GM-CSF, авторы настоящего изобретения признают, что соединения, нейтрализующие GM-CSF, могут быть нестабильными при высоких концентрациях и могут также быть нестабильными в течение длительного периода хранения.

Действительно, имеется много путей, посредством которых соединения, нейтрализующие GM-CSF, такие как белки, могут быть нестабильными. Например, нестабильность белка может быть вызвана агрегацией или деградацией белка, а также химической нестабильностью из-за дезаминирования, деамидирования, окисления, разрыва и образования дисульфидных связей, гидролиза, сукцинимидирования, недисульфидного сшивания, дегликозилирования или "ферментативного потемнения" (реакции Майяра) или любой комбинации этих явления; см., например, Wang et al. (1999), *Int. J. Pharm.* 185:129-188. Кроме того, такие физико-химические параметры, как температура, значение pH, адсорбция на поверхности, соли, ионы металлов, хелатирующие агенты, физические силы, такие как силы сдвига, денатурирующие белок агенты, неводные растворители, концентрация белка, источник и чистота белка, морфизм белков или давление, могут влиять на стабильность белка.

Однако, в то время как многие факторы могут влиять на стабильность белка, могут также быть предприняты многие меры для стабилизации белка. Например, белок может быть стабилизирован внутри (посредством замены аминокислот) или снаружи. Внешняя стабилизация может быть достигнута путем добавления хелатирующих агентов, ионов металлов, восстановителей, полимеров, полиэтиленгликолей/полиолов, сывороточного альбумина, поверхностно-активных веществ, сахаров и полиолов, жирных кислот и фосфолипидов, аминокислот, буферов и т.д.; см., например, Wang, Y. and Hanson M. (1988), *J. Parental Sci. & Technology*, 42, Supplement: 4-26; Wang et al. (1999), *Int. J. Pharm.* 185:129-188. В целом, для стабилизации соединений, нейтрализующих GM-CSF, таких как антитела, в композиции, у специалиста есть много доступных вариантов.

В рассматриваемом случае авторы изобретения наблюдали, что соединения, нейтрализующие GM-CSF, могут агрегировать и/или могут не растворяться в высоких концентрациях. Много разных факторов могут вызвать агрегацию белка в композиции. В типичных процедурах очистки и хранения белковые композиции могут подвергаться воздействию условий и соединений, которые заставляют белок агрегировать с образованием димеров, тримеров или мультимеров белка, более крупных невидимых невооруженным глазом частиц и видимых частиц. Например, белки в композиции могут агрегировать в результате одного или более из следующего: хранения, воздействия повышенных температур, pH композиции, ионной силы композиции и присутствия некоторых поверхностно-активных агентов и эмульгаторов. Аналогично, белки могут агрегировать при воздействии на них сдвигового напряжения, такого как восстановление лиофилизированной белковой таблетки в растворе, очистка фильтрованием белкового образца, замораживание-размораживание, встряхивание или перенос белкового раствора с помощью шприца. Агрегация также может произойти в результате взаимодействия полипептидных молекул в растворе и на границе жидкость-воздух в сосудах для хранения. Конформационные изменения могут произойти в полипептидах, адсорбированных на границах воздух-жидкость и твердое вещество-жидкость, во время сжатия или расширения этих границ при перемешивании во время транспортировки. Такое перемешивание может вызывать агрегацию белка композиции и, в конечном счете, выпадение в осадок вместе с другими адсорбированными белками. Рост невидимых невооруженным глазом частиц может указывать на склонность к образованию видимых частиц. Как правило, образование разных типов агрегатов и частиц может быть проанализировано с помощью различных измерительных систем, основанных на размере агрегатов или частиц. Например, SEC (гель-проникающая хроматография), DLS (метод динамического рассеяния света), AUC измеряет димеры, тримеры, мультимеры, которые находятся в диапазоне нанометровых размеров; светоблокировка, микроскопия, динамическая визуализация, проточная цитометрия и счетчик Коултера измеряют невидимые невооруженным глазом частицы крупнее 1 мкм и небольшие видимые частицы.

Кроме того, воздействие на белковую композицию света может вызывать агрегацию белка. В настоящем изобретении, таким образом, предложены композиции, которые делают возможными высокие концентрации соединений, нейтрализующих GM-CSF, и которые снижают агрегацию этих соединений. Без связи с теорией, полагают, что уменьшение агрегации достигается путем контроля за одним или более вышеупомянутыми механизмами агрегации. Это может привести, например, к улучшенной стабильности продукта и к большей гибкости производственных процессов и условий хранения.

Целью авторов настоящего изобретения являлось предложение композиции с высокой концентрацией соединений, нейтрализующих GM-CSF, для того чтобы, например, обеспечить возможность уменьшения объема инъекции, которое обеспечит уменьшение таких нежелательных явлений, как боль, вызванная большим объемом инъекции, или обеспечить подкожное введение с небольшим объемом.

Поскольку это так, авторы настоящего изобретения наблюдали в ходе своих исследований некоторую нестабильность соединений, нейтрализующих GM-CSF, и, таким образом, стремились к улучшению этого нежелательного наблюдения. Соответственно, их целью было концентрирование соединений, ней-

трализирующих GM-CSF, при сохранении его в растворе, т.е. на стадии растворения. При этом у них было множество имеющихся вариантов и альтернатив, однако без какого-либо указания, что какой-либо из них будет пригодным для решения целевой задачи.

"Стадия растворения" означает, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, предпочтительно в концентрации по меньшей мере примерно 20 мг/мл, находится в растворе, т.е. растворено и/или диспергировано непосредственно в водном растворе (т.е. в водной фазе) композиции. Предпочтительно соединение, нейтрализующее GM-CSF, гомогенно растворено и/или диспергировано. "Гомогенно" означает, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, которое растворено и/или диспергировано в водной композиции, почти равномерно, предпочтительно равномерно, распределено в этой водной композиции, так что концентрация ("с") соединения, нейтрализующего GM-CSF ("n" в случае молярной массы или "m" в случае массы) почти идентична, предпочтительно идентична в (или во всем объеме) объеме ("v") водного раствора, т.е. значение  $c=n/v$  или  $c=m/v$  соответственно является почти постоянным, предпочтительно постоянным. Предпочтительно в композиции нет градиента концентрации.

Соответственно, стабильная композиция по настоящему изобретению, содержащая соединение, нейтрализующее GM-CSF, может предпочтительно рассматриваться как водный раствор, где соединение, нейтрализующее GM-CSF, непосредственно растворено и/или диспергировано.

"Раствор" представляет собой гомогенную смесь двух или более веществ/соединений. В такой смеси растворенное вещество (в настоящем изобретении соединение, нейтрализующее GM-CSF,) растворено (как описано выше) в другом веществе (в настоящем изобретении предпочтительно в водной композиции), также известном как растворитель.

Учитывая вышесказанное, предпочтительно соединение, нейтрализующее GM-CSF, гетерогенно не растворено и/или не диспергировано в водном растворе. Термин "растворенное состояние" также включает то, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, предпочтительно по существу не эмульгировано или более предпочтительно совсем не эмульгировано в водном растворе.

Кроме того, термин "растворенное состояние" включает то, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, предпочтительно по существу не инкапсулировано и/или не заключено (предпочтительно менее чем 2, 1 или 0,5% соединения, нейтрализующего GM-CSF, может быть инкапсулировано и/или заключено или более предпочтительно не инкапсулировано и/или не заключено совсем, например, в липосомы, многослойные липосомы или т.п.).

Соответственно, одно предпочтительное воплощение настоящего изобретения представляет собой жидкую композицию, содержащую соединение, нейтрализующее GM-CSF, которое стабильно и не образует конъюгаты/агрегаты/частицы или фрагменты/продукты деградации при хранении в течение длительного периода времени, и эта композиция подходит для подкожного введения.

В частности, после тестирования множества разных стабилизирующих агентов авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединения, нейтрализующие GM-CSF, могут быть стабилизированы, если регулятор тоничности добавлен к раствору, который должен быть сохранен. Примеры регуляторов тоничности включают, без ограничения ими, сахара и сахарные спирты. Простые сахара называются моносахаридами и включают глюкозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, рибозу, маннозу, лактулозу, аллозу, альтрозу, гулозу, идозу, талозу, арабинозу и ликсозу. Более предпочтительными для настоящего изобретения являются дисахариды, которые включают, например, сахарозу, мальтозу, лактозу, изомальтозу, трегалозу и целлобиозу. Сахарные спирты включают сорбит, маннит, глицерин, эритрит, мальтит, ксилит, полиглицитол. В предпочтительном воплощении сахар представляет собой невосстанавливающий сахар, такой как сахароза или трегалоза. Невосстанавливающие сахара характеризуются отсутствием структуры в виде открытой цепи, поэтому они не чувствительны к окислительно-восстановительным реакциям. Следовательно, один или более невосстанавливающих сахаров, таких как сахароза или трегалоза, или один или более сахарных спиртов, таких как манит или сорбит, могут быть добавлены к композиции, содержащей соединение, нейтрализующее GM-CSF. Также к раствору могут быть добавлены комбинации невосстанавливающих сахаров и сахарных спиртов, например сахароза и маннит, сахароза и сорбит, трегалоза и маннит или трегалоза и сорбит. Более предпочтительно добавляют сахарные спирты маннит и/или сорбит, предпочтительно в их D-форме, наиболее предпочтительно к раствору добавляют сорбит. Концентрация регулятора тоничности, предпочтительно сорбита, составляет от примерно 1 до примерно 15% (мас./об.), предпочтительно от примерно 2 до примерно 10% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 3 до примерно 7% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 4 до примерно 6% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 5% (мас./об.).

Другим особенно предпочтительным веществом для стабилизации соединений, нейтрализующих GM-CSF, в высокой концентрации, в отношении продолжительного хранения, является буферная система со значением pH от примерно 4 до примерно 10, предпочтительно от примерно 4 до примерно 7, более предпочтительно от примерно 4 до примерно 6, или от примерно 5 до примерно 7, даже более предпочтительно от примерно 5,5 до примерно 6,5 и наиболее предпочтительно со значением pH, равным примерно 5,8. Буфер может быть предпочтительно выбран из гистидинового буфера, ацетатного буфера и цитратного буфера. При упоминании здесь, аминокислота означает L-аминокислоту или D-аминокислоту, где L-аминокислота является предпочтительной. Предпочтительно для буферной сис-

темы используют гистидин или его соль. Предпочтительно соль представляет собой хлорид, фосфат, ацетат или сульфат, более предпочтительно соль представляет собой хлорид. рН гистидиновой буферной системы составляет от примерно 5 до примерно 7, предпочтительно от примерно 5,5 до примерно 6,5, более предпочтительно рН составляет примерно или точно 5,8. Значение рН может быть отрегулировано путем использования традиционно используемых оснований и кислот, предпочтительно NaOH, или можно использовать смесь гистидина и гистидиновой соли так, что не потребуются регулирование рН. Концентрация буферной системы, предпочтительно гистидиновой буферной системы, составляет от примерно 10 до примерно 50 мМ, предпочтительно от примерно 20 до примерно 40 мМ, более предпочтительно примерно 30 мМ.

Кроме того авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединения, нейтрализующие GM-CSF, могут быть стабилизированы при добавлении одного или более поверхностно-активных веществ, аминокислот, антиоксидантов и/или хелатирующих агентов к раствору, который должен быть сохранен.

В соответствии с предпочтительным воплощением комбинацию буферной системы, предпочтительно гистидинового буфера, регулятора тоничности, предпочтительно сахарного спирта, более предпочтительно маннита или еще более предпочтительно сорбита, и поверхностно-активного вещества, предпочтительно полисорбата 20 (PS20; TWEEN® 20), полисорбата 80 (PS80; TWEEN® 80) и/или полксамеров, используют для стабилизации соединений, нейтрализующих GM-CSF, в растворе, чтобы предупредить агрегацию и сделать композицию достаточно стабильной для длительного хранения и/или одного или более циклов замораживания/размораживания. Было показано, что с точки зрения стабильности предпочтительнее иметь примерно 6% (мас./об.) и выше сахарного спирта, предпочтительно сорбита, в композиции. Однако верхний предел осмоляльности композиции устанавливается равным примерно 500 мОсм/кг, который все еще является гиперосмотическим, но аналогичным по осмоляльности одобренному продукту (Synagis; Im. administration). Таким образом, был найден компромисс между оптимальной стабильностью, тоничностью и концентрацией соединения, нейтрализующего GM-CSF, как описано в примерах настоящего изобретения.

Предпочтительная концентрация сахарного спирта, предпочтительно сорбита, следовательно, составляет от примерно 3 до примерно 7% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 4 до примерно 6% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 5% (мас./об.).

В некоторых воплощениях настоящего изобретения препараты или композиции по изобретению, содержащие соединение, нейтрализующее GM-CSF, не содержат или по существу не содержат хлорид натрия. "По существу не содержат" означает, что концентрация хлорида натрия составляет или близка к 0 мМ, например менее чем примерно 50 мМ, предпочтительно менее чем примерно 20 мМ, более предпочтительно менее чем примерно 10 мМ, еще более предпочтительно менее чем примерно 5 мМ и наиболее предпочтительно менее чем примерно 2 мМ или даже менее чем примерно 1 мМ.

Используемая концентрация соответствующих соединений, нейтрализующих GM-CSF, составляет по меньшей мере примерно 20 мг/мл, предпочтительно по меньшей мере примерно 50 мг/мл, более предпочтительно по меньшей мере примерно 60 мг/мл, в жидкой композиции, которую предполагают хранить, подвергать замораживанию/размораживанию, и/или в готовой к применению. В настоящем изобретении используют концентрации от примерно 20 до примерно 200 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до примерно 200 мг/мл, более предпочтительно от примерно 50 до примерно 180 мг/мл, еще более предпочтительно от примерно 70 до примерно 170 мг/мл, еще более предпочтительно от примерно 75 до примерно 165 мг/мл наиболее предпочтительно примерно 80 мг/мл или примерно 150 мг/мл.

Срок годности полученной жидкой композиции имеет предпочтительное минимальное значение 24 месяца при 2-8°C, предпочтительно 36 месяцев при 2-8°C, более предпочтительно 48 месяцев при 2-8°C, наиболее предпочтительно 60 месяцев при 2-8°C или по меньшей мере 28 суток при комнатной температуре (25±2°C).

Настоящее изобретение относится к стабильной композиции, предпочтительно к стабильной жидкой композиции, которая неожиданно обеспечивает возможность длительного хранения соединений, нейтрализующих GM-CSF. Эта композиция полезна, в частности, так как она более удобна для использования пациентом, так как соединения, нейтрализующие GM-CSF, в этой композиции имеют высокую концентрацию с тем, чтобы уменьшить такие побочные эффекты, как боль, вызванную большим объемом инъекции.

Соответственно, один аспект изобретения основан на обнаружении того, что композиции, содержащие соединение, нейтрализующее GM-CSF, буферную систему, предпочтительно выбранную из гистидинового буфера, ацетатного буфера и/или цитратного буфера с предпочтительным значением рН от 5 до 7, регулятор тоничности, предпочтительно выбранный из невосстанавливающих сахаров, таких как сахароза или трегалоза, или сахарных спиртов, таких как маннит или сорбит, и одно или более из поверхностно-активных веществ, аминокислот, антиоксидантов и/или хелатирующих агентов, предпочтительно поверхностно-активных веществ, которые предпочтительно выбраны из одного или более из полисорбата 20, полисорбата 80 или полксамеров, являются достаточно стабильными для длительного

хранения, и/или циклов замораживания/размораживания, и/или напряжения сдвига (стабильность при встряхивании/перемешивании). Композиция по изобретению имеет много преимуществ по сравнению со стандартными буферными композициями. В одном из аспектов композиция демонстрирует минимальную агрегацию при длительном хранении без вредных эффектов, которые можно было бы ожидать от композиций с высокой концентрацией белка. Другие преимущества композиции согласно изобретению представляют собой минимальную фрагментацию соединения, нейтрализующего GM-CSF, и отсутствие значительного влияния на биоактивность соединения, нейтрализующего GM-CSF, в течение длительного хранения, и низкую вязкость композиции.

Предпочтительными воплощениями первого аспекта изобретения являются следующие композиции по изобретению, где соединение, нейтрализующее GM-CSF, представляет собой полипептид, пептидомиметик, нуклеиновую кислоту или малую молекулу.

В предпочтительном воплощении соединение, нейтрализующее GM-CSF, (которое предпочтительно представляет собой полипептид и более предпочтительно антитело или его функциональный фрагмент) связывается или специфически связывается с GM-CSF или с рецептором GM-CSF. Предполагается, что GM-CSF или рецептор GM-CSF имеет животное происхождение, включая, но без ограничения ими, млекопитающих, таких как лабораторные животные (грызуны, такие как крысы, морские свинки, хомяки или мыши, приматы, не являющиеся человеком, такие как яванский макак или макаки), домашние или ручные животные (например, собаки или кошки), фермерские или сельскохозяйственные животные (например, крупный рогатый скот, овцы, козы и свиньи) и/или человек. Предпочтительно GM-CSF или рецептор GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF (*Homo sapiens*) или человеческий рецептор GM-CSF соответственно или GM-CSF примата, не являющегося человеком, или рецептор GM-CSF примата, не являющегося человеком соответственно. Особенно предпочтительные варианты (гомологи) GM-CSF примата, не являющегося человеком, или рецептора GM-CSF примата, не являющегося человеком, включают GM-CSF или рецептор GM-CSF гиббонов (*Nomascus concolor*, также известный как западный черный хохлатый гиббон) и обезьян семейства макак, например макак-резус (Макака мулатка) и яванских макак (*Macaca fascicularis*). В соответствии с особенно предпочтительным воплощением изобретения соединение, связывающееся с GM-CSF или с рецептором GM-CSF, (предпочтительно антитело или его фрагмент) проявляет перекрестную реактивность между человеком и по меньшей мере одним из видов обезьян, упомянутых выше. Например, антитело или его фрагмент способны связываться (и нейтрализовать его) как с человеческим GM-CSF, так и с GM-CSF яванского макака (*Macaca fascicularis*). Это особенно полезно для молекулы антитела, которая предназначена для терапевтического введения людям, так как такое антитело должно пройти через множество тестов, предшествующих утверждению регулирующим органом, из которых некоторые ранние тесты включают виды животных, не являющихся человеком. При проведении таких тестов, как правило, желательно использовать в качестве вида, не являющегося человеком, вид, имеющий высокую степень генетического сходства с людьми, (например, приматы, не являющиеся человеком, такие как яванский макак), так как результаты, полученные таким образом, как правило, с высокой степенью вероятности прогнозируют соответствующие результаты, которые можно ожидать при введении этой молекулы людям. Однако сила таких прогнозов, основанных на испытаниях на животных, зависит, по меньшей мере частично, от сравнимости молекулы и является очень высокой, когда благодаря перекрестной межвидовой реактивности ту же терапевтическую молекулу можно вводить людям и животным моделям. Как в этом воплощении изобретения, когда молекула антитела перекрестно реактивна в отношении одного и того же антигена у людей и у других близкородственных видов, тесты могут быть выполнены с использованием одной и той же молекулы антитела у людей и у этого близкородственного вида, например в одном из видов обезьян, упомянутых выше. Это увеличивает как эффективность самих тестов, так прогностическую силу, обеспечиваемую такими тестами, относительно поведения таких антител у людей, конечного вида, представляющего интерес с терапевтической точки зрения. Предпочтительно, чтобы антитело или его функциональный фрагмент, связывающийся с GM-CSF или с рецептором GM-CSF, представляли собой моноклональное антитело или его функциональный фрагмент. То же самое справедливо для альтернативных воплощений соединений, нейтрализующих GM-CSF, которые не являются антителами и не произведены из антител.

Предпочтительно соединение, нейтрализующее GM-CSF, представляет собой человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент.

Соединение, нейтрализующее GM-CSF, может представлять собой антитело или его функциональный фрагмент, которое(ый) связывается с эпитопом GM-CSF человека и примата, не являющегося человеком. Этот эпитоп предпочтительно содержит аминокислоты 23-27 (RRLLN) и/или аминокислоты 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL). Вариабельность в положении 67 в пределах участка аминокислотной последовательности 65-77 отражает гетерогенность в этой части GM-CSF между GM-CSF человека и гиббона (где положению 67 соответствует R), с одной стороны, и обезьян семейства макак, например яванского макака и макак-резусов (где положению 67 соответствует Q), с другой стороны. Если эпитоп содержит два участка аминокислотной последовательности, которые не являются смежными, такие как 23-27 (RRLLN) и 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL), то этот эпитоп также может называться "прерывистым" эпитопом. Указанный эпитоп GM-CSF или указанный прерывистый эпитоп GM-CSF могут дополнительно содержать



аминокислоты 28-31 (LSRD), аминокислоты 32-33 (TA) и/или аминокислоты 21-22 (EA).

Человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент предпочтительно содержит в своей вариабельной области тяжелой цепи участок CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1-13 и 56; предпочтительно CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Любая из указанных последовательностей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи может также существовать в вариабельной области тяжелой цепи вместе с участком CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и участком CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Кроме того, человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент может содержать в вариабельной области своей легкой цепи участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, участок CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и участок CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В особенно предпочтительном аспекте изобретения человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент содержат в своей вариабельной области легкой цепи участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и в своей вариабельной области тяжелой цепи участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13 и 56, наиболее предпочтительно SEQ ID NO: 2.

В соответствии с предпочтительным воплощением человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент содержат в своей вариабельной области легкой цепи аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 19, 54 и 55. Согласно другому предпочтительному воплощению, человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент содержат в своей вариабельной области тяжелой цепи аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 20-33, 52 и 53. Человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент могут в еще одном воплощении содержать аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 34, и/или аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 35-48, наиболее предпочтительно SEQ ID NO: 35.

Человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент могут содержать одну или более аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 98 или 99% гомологию с соответствующей аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-48 и 52-56, предпочтительно с соответствующей аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-18 и 56, и/или с аминокислотной последовательностью каркасных участков (FR) внутри аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 19-48 и 52-55. Таким образом, в предпочтительном воплощении человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент могут содержать одну или более аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 98 или 99% гомологию с соответствующей аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-18 и 56.

Альтернативно, в любой из аминокислотных последовательностей CDR, представленных в любой из SEQ ID NO: 1-18 и 56, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот могут быть заменены.

Предпочтительно такая CDR с заменами все еще способна связываться с GM-CSF, как описано здесь.

В качестве альтернативы или дополнения, предпочтительно человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент может содержать одну или более аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 98 или 99% гомологию с соответствующей аминокислотной последовательностью области VH, VL, H или L соответственно, как представлено в любой из SEQ ID NO: 19-48 и 52-55. Предпочтительно гомология наблюдается по всей аминокислотной последовательности VH, VL, H или L. Более предпочтительно гомология находится в пределах CDR, как описано выше, или гомология находится в пределах FR (или не-CDR) такой области VH, VL, H или L, как представлено в любой из SEQ ID NO: 19-48 и 52-55. Соответственно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот могут быть заменены в каждом FR. Такие варианты FR с заменой все еще способны связываться с GM-CSF, как описано здесь.

Специалист может легко идентифицировать FR (или не-CDR) в пределах SEQ ID NO: 19-48 и 52-55, так как SEQ ID NO: 1-18 и 56 показывают последовательности CDR, содержащиеся в одной или более последовательностях VH, VL, H или L, показанных в SEQ ID NO: 19-48 и 52-55. А именно, в перечне

последовательностей в идентификаторе последовательности <223> представлено обозначение каждой из аминокислотных последовательностей. Одинаковые обозначения указывают на то, что эти аминокислотные последовательности "соответствуют" друг другу, а это означает, что CDR находится в области VH, VL, H или L, например, SEQ ID NO: 16, 17, 18 представляют собой аминокислотные последовательности CDR, которые содержатся в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 19 (так как все они обозначены "5-306").

В качестве дополнительной иллюстрации, если аминокислоты заменены в одной или более или во всех CDR или FR тяжелой и/или легкой цепи, предпочтительно, чтобы позже полученная "замещенная" последовательность была по меньшей мере на 70%, более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 90%, особенно предпочтительно на 95%, наиболее предпочтительно на 98% или на 99% идентична "исходной" последовательности CDR или FR. Это означает, что от длины CDR или FR зависит, в какой степени она гомологична "замещенной" последовательности.

Гомологию определяют с помощью стандартных программ выравнивания последовательностей, таких как Vector NTI (InforMax™, Maryland, USA) или более предпочтительно с помощью программы BLASTP, предпочтительно версии blastp 2.2.5 (November 16, 2002; cf. Altschul, S.F. et al. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). Процент гомологии основан на выравнивании последовательностей всего полипептида (матрица: BLOSUM 62; штрафы за разрыв: 11.1; граничное значение установлено на  $10^{-3}$ ) с использованием любой аминокислотной последовательности CDR, VH, VL, H или L в качестве эталона при парном сравнении. Его рассчитывают как процент от числа "положительных результатов" (гомологических аминокислот), указанного в результате работы программы BLASTP, деленного на общее число аминокислот, выбранных программой для выравнивания.

При использовании в данном описании гомология аминокислотных или нуклеотидных последовательностей может использоваться взаимозаменяемо с термином "идентичность". Термин "гомология", используемый в настоящем изобретении, означает процент попарно идентичных остатков - после гомологичного выравнивания последовательности аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению с интересующей последовательностью - в отношении числа остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Как описано выше, программы для определения гомологии (или идентичности) сравнивают выровненные последовательности последовательно - аминокислоту за аминокислотой, и могут быть установлены на различные уровни жесткости при сравнении (например, идентичная аминокислота, консервативная аминокислотная замена и т.д.). При использовании в данном описании две представляющие интерес аминокислоты рассматривают как "консервативные замены" друг друга, если каждая из них принадлежит к тому же самому химическому классу, т.е. к кислым, неполярным/гидрофобным, незаряженным полярным и основным. В качестве неограничивающего примера две разные аминокислоты, принадлежащие к классу неполярных аминокислот, рассматривают как "консервативные замены" друг друга, даже если эти две аминокислоты не идентичны, в то время как неполярная аминокислота, с одной стороны, и основная аминокислота, с другой стороны, не рассматриваются как "консервативные замены" друг друга. В Panel 3.1 of "Molecular Biology of the Cell", 4<sup>th</sup> Edition (2002), by Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts and Walter аминокислоты сгруппированы в четыре основные группы: кислые, неполярные, незаряженные полярные и основные. Такое объединение в группы может быть использовано для определения, в контексте настоящего изобретения, является ли конкретная аминокислота консервативной заменой другой интересующей аминокислоты. Вышеупомянутые основные группы могут дополнительно быть подразделены, например, на небольшие неполярные и большие неполярные аминокислоты, большие ароматические аминокислоты и т.д. Термин "консервативная замена аминокислоты" также указывает на любую аминокислотную замену данного аминокислотного остатка, где заменяющий остаток настолько химически подобен данному остатку, что не приводит к существенному снижению функции полипептида (например, связывания).

Соединение, нейтрализующее GM-CSF, как правило, готовят в виде фармацевтической композиции для парентерального, например внутривенного, внутривнутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, местного или внутрикожного, введения субъекту, при этом подкожное введение является предпочтительным. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию, предпочтительно водную композицию.

В одном воплощении концентрация соединения, нейтрализующего GM-CSF, в жидкой фармацевтической композиции, составляет по меньшей мере 20 мг/мл, предпочтительно по меньшей мере примерно 50 мг/мл, более предпочтительно по меньшей мере примерно 60 мг/мл в жидкой композиции, которую следует хранить, подвергать замораживанию/размораживанию и/или которая готова к применению. В настоящем изобретении используют концентрации, составляющие от примерно 20 до примерно 200 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до примерно 200 мг/мл, более предпочтительно от примерно 50 до примерно 180 мг/мл, еще более предпочтительно от примерно 70 до примерно 170 мг/мл, еще более предпочтительно от примерно 75 до примерно 165 мг/мл и наиболее предпочтительно примерно 80 мг/мл или примерно 150 мг/мл. В некоторых воплощениях, например, когда композиция предназначена для подкожного введения, можно использовать более высокие концентрации соединения, нейтрализующего GM-CSF.

Как было отмечено выше, композиции по настоящему изобретению содержат буфер. Используемый в данном описании термин "буфер" относится к добавленной композиции, которая позволяет жидкой композиции противостоять изменениям pH. В некоторых воплощениях добавленный буфер позволяет жидкой композиции противостоять изменениям pH посредством действия его кислотно-основных сопряженных компонентов. Примеры подходящих буферов включают, без ограничения ими, буферные гистидиновые, ацетатные или цитратные системы.

Используемый в данном описании термин "специфически связывается" или родственные выражения, такие как "специфическое связывание", "связывающийся специфически", "специфически связывающий агент" и т.д., относится к способности GM-CSF-нейтрализующего соединения и предпочтительно (человеческого) (моноклонального) антитела или его функционального фрагмента отличать свою мишень (например, GM-CSF или рецептор GM-CSF) от любого другого возможного антигена, отличного от GM-CSF или рецептора GM-CSF, в такой степени, что из множества различных антигенов в качестве возможных партнеров связывания, связывается или в значительной степени связывается только GM-CSF/рецептор GM-CSF. В контексте настоящего изобретения мишень "в значительной степени" связана, когда из множества одинаково доступных разных антигенов в качестве возможных партнеров связывания мишень связывается по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно по меньшей мере в 50 раз, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз или чаще (в кинетическом смысле), чем любой другой антиген, отличный от мишени. Такие кинетические измерения можно выполнять, например используя технологию SPR (поверхностный плазмонный резонанс), например прибор Biacore. Используемые в данном описании термины "(специфически) связывающийся с" или родственные термины, такие как "(специфически) распознающий", "направленный на", "(специфически) взаимодействующий с" и "(специфически) реагирующие с", означают в соответствии с данным изобретением, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, (например, антитело) проявляет заметную аффинность к своей мишени (например, к GM-CSF или к рецептору GM-CSF) и, как правило, не обладает значительной реакционной активностью в отношении белков или антигенов, отличных от указанных выше мишеней. "Заметная аффинность" включает связывание с аффинностью примерно  $10^{-6}$  М (KD) или сильнее, такой как  $10^{-7}$  М или сильнее. Предпочтительно связывание считается специфическим, когда аффинность связывания составляет примерно  $10^{-11}$ - $10^{-8}$  М, предпочтительно примерно  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  М, более предпочтительно примерно  $10^{-11}$ - $10^{-10}$  М. Взаимодействует ли или связывается ли соединение (например, антитело) с мишенью, можно легко проанализировать путем, например, сравнения взаимодействия указанного соединения с его целевым белком или антигеном с взаимодействием указанного соединения с белками или антигенами, отличными от его мишени. Предпочтительно соединение по изобретению по существу не связывается или не способно связываться с белками или антигенами, отличными от GM-CSF или рецептора GM-CSF. Термин "по существу не связывается" или "не способен связываться" означает, что соединения по настоящему изобретению не проявляют более чем 30%, предпочтительно более чем 20%, более предпочтительно более чем 10%, особенно предпочтительно более чем 9, 8, 7, 6 или 5% реакционной способности с белками или антигенами, отличными от GM-CSF или рецептора GM-CSF.

При использовании здесь "нейтрализация", "нейтрализующее вещество", "нейтрализующий" и их грамматически связанные варианты относятся к частичному или полному ослаблению биологического(их) действия(й) GM-CSF. Такое частичное или полное ослабление биологического(их) действия(й) GM-CSF происходит из-за модификации, прерывания и/или отмены GM-CSF-опосредованных процессов, таких как сигнальная трансдукция, что проявляется, например, во внутриклеточной сигнализации, клеточной пролиферации или высвобождении растворимых веществ, повышении или понижении уровня активации внутриклеточного гена, что приводит, например, к экспрессии поверхностных рецепторов для лигандов, отличных от GM-CSF. Специалисту в данной области техники понятно, что существует множество способов определения, следует ли соединение, например антитело или его функциональный фрагмент, классифицировать, как нейтрализующее вещество. В качестве примера это может быть выполнено посредством стандартного *in vitro* теста, выполняемого, как правило, следующим образом: В первом пролиферационном эксперименте клеточную линию, уровень пролиферации которой, как известно, зависит от активности GM-CSF, инкубируют с серией образцов с различной концентрацией GM-CSF и после инкубации измеряют уровень пролиферации клеточной линии. Из этого измерения определяют концентрацию GM-CSF, обеспечивающую полумаксимальную пролиферацию клеток. Затем выполняют второй пролиферационный эксперимент, используя в каждой серии образцов такое же количество клеток, которое использовали в первом пролиферационном эксперименте, определенную выше концентрацию GM-CSF, и на этот раз варьируя концентрации соединения, предположительно являющегося агентом, нейтрализующим GM-CSF. Клеточную пролиферацию снова измеряют для определения концентрации анализируемого соединения, которой достаточно, чтобы вызвать полумаксимальное ингибирование роста. Если полученный график зависимости ингибирования роста от концентрации анализируемого соединения имеет сигмовидную форму, отражающую уменьшение клеточной пролиферации при увеличении концентрации анализируемого соединения, тогда некоторая степень ингибирования роста имела место, т.е. активность GM-CSF была до некоторой степени нейтрализована. В таком случае представляющее интерес соединение можно рассматривать как "нейтрализующий агент" в контексте настоящего изобретения.

бретения. Одним примером клеточной линии, уровень пролиферации которой, как известно, зависит от активности GM-CSF, является клеточная линия TF-1, описанная в Kitamura, T. et al. (1989). *J. Cell Physiol.* 140, 323-34.

Как понятно специалисту в данной области техники, уровень клеточной пролиферации не является единственным параметром, с помощью которого GM-CSF-нейтрализующая способность может быть установлена. Например, измерение уровня сигнальных молекул (например, цитокинов), уровень секреции которых зависит от GM-CSF, можно использовать для идентификации предполагаемого GM-CSF-нейтрализующего агента/GM-CSF-ингибирующего соединения.

Другие примеры клеточных линий, которые можно использовать для определения, является ли интересующее соединение, такое как антитело или его функциональный фрагмент, нейтрализующим агентом в отношении активности GM-CSF, включают AML-193 (Lange, B. et al. (1987). *Blood* 70, 192-9); GF-D8 (Rambaldi, A. et al. (1993). *Blood* 81, 1376-83); GM/SO (Oez, S. et al. (1990). *Experimental Hematology* 18, 1108-11); MO7E (Avanzi, G.C. et al. (1990). *Journal of Cellular Physiology*, 145, 458-64); TALL-103 (Valtieri, M. et al. (1987). *Journal of Immunology*, 138, 4042-50); и UT-7 (Komatsu, N. et al. (1991). *Cancer Research*, 51, 341-8).

Понятно, что нейтрализация GM-CSF в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнена либо вне клеток, несущих рецепторы GM-CSF, либо внутри указанных клеток. Таким образом, нейтрализация GM-CSF соединением может представлять собой либо ингибирование или предотвращение связывания GM-CSF с его специфическим рецептором, либо ингибирование внутриклеточного сигнала, индуцированного связыванием цитокинов с их рецепторами. Соединение, нейтрализующее GM-CSF, может, например, непосредственно связываться с GM-CSF или с рецептором GM-CSF, тем самым в обоих случаях препятствуя биологическим действиям GM-CSF.

Как определено в данном описании изобретения выше, ингибиторы GM-CSF могут быть выбраны из группы, состоящей из полипептида, пептидомиметика, молекулы нуклеиновой кислоты и малой молекулы.

Термин "полипептид", при использовании здесь, описывает группу молекул, которые обычно состоят по меньшей мере из 30 аминокислот, соединенных друг с другом с помощью ковалентной пептидной связи. В соответствии с изобретением группа полипептидов включает "белки", состоящие из одного полипептида или более чем одного полипептида. Термин "полипептид" также описывает фрагменты белков, если эти фрагменты состоят по меньшей мере из 30 аминокислот. Хорошо известно в данной области техники, что полипептиды могут образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, т.е. состоящие более чем из одной полипептидной молекулы. Такие мультимеры также включены в определение термина "полипептид". Молекулы полипептида, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или неидентичными.

Соответствующие структуры таких мультимеров более высокого порядка, соответственно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая в своей естественной форме состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "полипептид" и "белок" также относятся к природным и не встречающимся в природе модифицированным полипептидам/белкам, где модификация осуществляется, например, посредством посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, образование дисульфидных мостиков и т.п., или посредством химических модификаций, таких как пэггилирование. Такие модификации хорошо известны в данной области техники.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" определяет в контексте данного изобретения полимерные макромолекулы, состоящие из нескольких повторяющихся звеньев фосфорной кислоты, сахара и пуриновых и пиримидиновых оснований. Воплощения этих молекул включают ДНК, РНК и ПНК (пептид-нуклеиновая кислота). Нуклеиновая кислота может быть одонитевой или двунитевой, линейной или кольцевой. Особенно предпочтительным воплощением нуклеиновой кислоты в контексте данного изобретения является аптамер. Нуклеиново-кислотные аптамеры представляют собой молекулы ДНК или РНК, которые были выбраны из случайного пула, на основании их способности связывать другие молекулы. Были выбраны аптамеры, которые связывают нуклеиновую кислоту, белки, небольшие органические соединения и даже целые организмы. Они состоят из обычно коротких нитей олигонуклеотидов, обычно из 50 оснований или менее.

Термин "малая молекула" определяет группу органических лекарственных соединений, имеющих молекулярную массу менее 1000 Да, предпочтительно вплоть до 800 Да, и более предпочтительно от 300 до 700 Да. Верхний предел молекулярной массы малой молекулы предусматривает возможность быстро диффундировать через клеточные мембраны так, что они могут достигать внутриклеточных участков действия. Соответствующие малые молекулы могут быть получены, по меньшей мере частично, из рандомизированной пептидной библиотеки. Библиотеки малых молекул, подходящих для настоящего изобретения, хорошо известны в данной области техники и/или могут быть приобретены у коммерческих дистрибьютеров.

Термин "пептидомиметик" описывает небольшую белковоподобную цепь, предназначенную для

имитации пептида. Этот тип молекулы искусственно получают путем модификации существующего пептида, для того чтобы изменить свойства молекулы. Например, родительский существующий пептид модифицируют для изменения стабильности или биологической активности молекулы. Эти модификации включают изменение каркаса и включение неприродных аминокислот.

Термин "рецептор GM-CSF" относится к рецептору GM-CSF физиологической клеточной поверхности, который описан в данной области техники, как гетеромер альфа-цепи (CD116) и общей бета (бета-с) субъединицы.

Предпочтительное воплощение нейтрализующего полипептида представляет собой антитело или его функциональный фрагмент, более предпочтительно человеческое антитело или его функциональный фрагмент. Методы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 и Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Определение термина "антитело" включает такие воплощения, как моноклональные, химерные, одноцепочечные, гуманизированные и человеческие антитела. В дополнение к полноразмерным антителам, это определение также включает производные антител и фрагменты антител, такие как, среди прочего, Fab-фрагменты. Фрагменты антител или их производные также включают фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv или однодоменные антитела, такие как доменные антитела или нанотела, антитела с единичным вариабельным доменом или единичный вариабельный домен иммуноглобулина, содержащий только один вариабельный домен, который может представлять собой V<sub>H</sub>H, V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>, который специфически связывает антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов; см., например, Harlow and Lane (1988) и (1999), loc. cit.; Kontermann and Dubel, Antibody Engineering, Springer, 2<sup>nd</sup> ed. 2010 и Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009. Указанный термин также включает диатела или переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (DART). Кроме того, рассматриваются (биспецифические) одноцепочечные диатела, tandemные диатела (Tandab), "мини-антитела", примером которых является следующая структура: (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (scFv-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> или (scFv-CH<sub>3</sub>-scFv)<sub>2</sub>, "Fc DART" и "IgG DART", мультитела, такие как триатела. Единичные вариабельные домены иммуноглобулина включают не только полипептид единичного вариабельного домена выделенного антитела, но также более крупные полипептиды, которые содержат один или более мономеров полипептидной последовательности единичного вариабельного домена антитела.

Кроме того, термин "антитело", при использовании в данном описании изобретения, также относится к производным и вариантам антител, описанным в настоящем документе, которые демонстрируют такую же специфичность, что и описанные антитела. Примеры "вариантов антител" включают гуманизированные варианты нечеловеческих антител, антитела "с созревшей аффинностью" (см., например, Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., Biochemistry, 30, 10832-10837 (1991)) и мутанты антител с измененной(ыми) эффекторной(ыми) функцией(ями) (см., например, патент US 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.).

Термин "антитело" также включает иммуноглобулины (Ig) разных классов (т.е. IgA, IgG, IgM, IgD и IgE) и подклассов (таких как IgG1, IgG2 и т.д.). Производные антител, которые также подпадают под определение термина антитело в контексте настоящего изобретения, включают модификации таких молекул, например гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, образование дисульфидных связей, фарнезилирование, гидроксильное, метилирование или эстерификацию.

Функциональный фрагмент антитела включает домен F(ab')<sub>2</sub> фрагмента, Fab-фрагмент, scFv или конструкции, содержащие единичные вариабельные домены иммуноглобулина или полипептиды однодоменного антитела, например единичные вариабельные домены тяжелой цепи или единичные вариабельные домены легкой цепи, а также другие фрагменты антител, как описано выше. F(ab')<sub>2</sub> или Fab могут быть сконструированы так, чтобы свести к минимуму или полностью удалить межмолекулярные дисульфидные взаимодействия, которые происходят между доменами CH<sub>1</sub> и CL.

Термин "человеческое" антитело, при использовании здесь, следует понимать как означающий, что антитело или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную(ые) последовательность(и), содержащую(ие)ся в репертуаре человеческих антител эмбрионального типа. Для определенности в данном описании изобретения антитело или его фрагмент может считаться человеческим, если оно состоит из такой(их) (а) человеческой(их) аминокислотной(ых) последовательности(ей) эмбрионального типа, т.е. если аминокислотная(ые) последовательность(и) представляющего интерес антитела или его функционального фрагмента идентична(ы) экспрессируемой(ым) человеческой(им) аминокислотной(ым) последовательности(ей) эмбрионального типа человека. Антитело или его функциональный фрагмент также может рассматриваться как человеческие, если он(о) состоит из (а) последовательности(ей), которая(ые) отклоняет(ют)ся от его(их) самой(ых) близкой(их) человеческой(их) последовательности(ей) эмбрионального типа не более, чем можно было бы ожидать на основании следов соматической сверхмутации. Кроме того, антитела многих млекопитающих, не являющихся людьми, например грызунов, таких как мыши и крысы, содержат аминокислотные последовательности V<sub>H</sub> CDR3, которые, как можно ожидать, также существуют в экспрессируемом репертуаре человеческих антител. Любая(ые) такая(ие) последовательность(и) человеческого или нечеловеческого происхождения, которая(ые), как можно ожидать, су-

ществует в экспрессируемом человеческом репертуаре, также рассматривает(ют)ся "человеческой(ими)" в рамках настоящего изобретения. Термин "человеческое антитело", следовательно, включает антитела, имеющие переменные и константные области, по существу соответствующие последовательностям человеческого иммуноглобулина эмбрионального типа, известным в данной области, включая, например, описанные Kabat et al. (See Kabat et al. (1991) loc. cit.). Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого иммуноглобулина эмбрионального типа (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматическая мутация *in vivo*), например в CDR, и в частности в CDR3. Человеческое антитело может иметь по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или более положений, замененных аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью человеческого иммуноглобулина эмбрионального типа.

Нечеловеческие и человеческие антитела или их функциональные фрагменты предпочтительно являются моноклональными. Особенно трудно получить человеческие антитела, которые являются моноклональными. В отличие от слияния мышиных В-клеток с иммортализованными клеточными линиями, слияния человеческих В-клеток с иммортализованными клеточными линиями не жизнеспособны. Таким образом, человеческие моноклональные антитела представляют собой результат преодоления значительных технических трудностей, существующих, как правило, в области технологии антител. Моноклональная природа антител делает их особенно подходящими для использования в качестве терапевтических агентов, так как такие антитела существуют в виде одного гомогенного молекулярного вида, который может быть хорошо охарактеризован и воспроизводимо получен и очищен. Эти факторы приводят к продуктам, биологические активности которых можно определить с высоким уровнем точности, что очень важно, если такие молекулы будут получать одобрение регуляторного органа для терапевтического введения людям. Термин "моноклональное антитело", при использовании в данном описании, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направлены против единичного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов антител, которые, как правило, включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они синтезируются культурой гибридомы, незагрязненной другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител и не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением можно получить методом гибридомы, впервые описанным Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены посредством технологии рекомбинантной ДНК (см., например, патент US 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговой библиотеки антител с использованием методов, описанных, например, в Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991).

Особенно предпочтительно, чтобы моноклональные антитела или соответствующие функциональные фрагменты были человеческими антителами или соответствующими функциональными фрагментами. Рассматривая антительные агенты, предназначенные для терапевтического введения людям, очень предпочтительно, чтобы эти антитела имели человеческое происхождение. После введения пациенту-человеку человеческое антитело или его функциональный фрагмент скорее всего не вызовет сильного иммуногенного ответа иммунной системы пациента, т.е. не будет распознан как чужеродный, т.е. нечеловеческий белок. Это означает, что против терапевтического антитела не будут образовываться антитела хозяина, т.е. пациента, которые в противном случае будут блокировать активность терапевтического антитела и/или ускорять элиминацию терапевтического антитела из организма пациента, тем самым противодействуя проявлению его желаемого терапевтического эффекта.

В соответствии с предпочтительным воплощением изобретения человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент, которые будут использоваться для фармацевтических целей, проявляет реактивность между человеком и по меньшей мере одним видом обезьян. Такая же межвидовая реактивность также является предпочтительной для всех других соединений, нейтрализующих/ингибирующих GM-CSF, не являющихся антителами и не происходящих от антител.

Согласно еще одному воплощению изобретения антитело может представлять собой антитело IgG. Изотип IgG содержит не только переменные области тяжелых и легких цепей антитела, ответственные за высоко дифференцированное распознавание и связывание антигена, но также и константные области тяжелых и легких полипептидных цепей антитела, обычно присутствующие в "естественно" продуцируемых антителах и в некоторых случаях даже модификацию одного или более сайтов углеводами. Такое гликозилирование, как правило, является признаком формата IgG и локализовано в константных областях, содержащих так называемый Fc-участок, целого антитела, который, как известно, вызывает различ-

ные эффекторные функции *in vivo*. Кроме того, Fc-участок опосредует связывание IgG с рецептором Fc, а также содействует наведению IgG на места с повышенным присутствием рецептора Fc, например на воспаленную ткань. Предпочтительно антитело IgG представляет собой антитело IgG1 или антитело IgG4, форматы, которых являются предпочтительными, так как их механизм действия *in vivo* особенно хорошо понят и охарактеризован. Это особенно относится к антителам IgG1.

Согласно еще одному воплощению изобретения, функциональный фрагмент антитела может предпочтительно представлять собой scFv, однодоменное антитело, Fv, VHH-антитело, диатело, тандемное диатело, Fab, Fab' или F(ab)<sub>2</sub>. Эти форматы могут, как правило, быть разделены на два подкласса, а именно те, которые состоят из одной полипептидной цепи, и те, которые содержат по меньшей мере две полипептидные цепи. Представители первого подкласса включают scFv (содержащий один участок VH и один участок VL, соединенные в одну полипептидную цепь посредством полипептидного линкера); однодоменное антитело (содержащее один вариабельный участок антитела), такое как VHH-антитело (содержащее один участок VH). Представители второго класса включают Fv (содержащий один участок VH и один участок VL в виде отдельных полипептидных цепей, которые нековалентно связаны друг с другом); диатело (содержащее две нековалентно связанные полипептидные цепи, каждая из которых содержит два вариабельных участка антитела - как правило, один VH и один VL на полипептидную цепь - и эти две полипептидные цепи образуют конформацию голова-к-хвосту, так что получается бивалентная молекула антитела); тандемное диатело (биспецифические одноцепочечные Fv-антитела, содержащие четыре ковалентно связанных иммуноглобулиновых вариабельных участка - VH и VL - с двумя разными специфичностями, образующие гомодимер, который в два раза больше, чем диатело, описанное выше); Fab (содержащий в качестве одной полипептидной цепи целую легкую цепь антитела, которая сама содержит участок VL, и всю константную область легкой цепи и в качестве другой полипептидной цепи часть тяжелой цепи антитела, содержащей целый участок VH и часть константной области тяжелой цепи, где указанные две полипептидные цепи межмолекулярно соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи); Fab' (как Fab выше, за исключением дополнительных восстановленных дисульфидных связей, содержащихся на тяжелой цепи антитела); и F(ab)<sub>2</sub> (содержащий две молекулы Fab', где каждая молекула Fab' связана с соответствующей другой молекулой Fab' посредством межцепочечных дисульфидных связей). В целом, функциональные фрагменты антитела описанного выше типа обеспечивают значительную гибкость в приспособлении, например, фармакокинетических свойств антитела, предназначенного для терапевтического введения, к конкретным имеющимся потребностям. Например, может быть желательно уменьшить размер вводимого антитела, чтобы увеличить степень проникновения в ткани, при лечении тканей, известных своей слабой васкуляризацией (например, суставов). В некоторых случаях может быть желательно увеличить скорость выведения терапевтического антитела из организма, где указанная скорость обычно увеличивается при уменьшении размера вводимого антитела. Фрагмент антитела определяется как функциональный фрагмент антитела в контексте настоящего изобретения, пока этот фрагмент сохраняет характеристики специфического связывания в отношении эпитопа/мишени родительского антитела, т.е. пока он специфически связывается с GM-CSF или с рецептором GM-CSF.

Согласно еще одному воплощению изобретения указанное антитело или его функциональный фрагмент может присутствовать в моновалентной моноспецифической; мультивалентной моноспецифической, в частности бивалентной моноспецифической; или мультивалентной мультиспецифической, в частности бивалентной биспецифической, формах. В целом, мультивалентное моноспецифическое, в частности бивалентное моноспецифическое антитело, такое как целый человеческий IgG, как описано выше, может обеспечить такое терапевтическое преимущество, что нейтрализация, осуществляемая таким антителом, потенцируется эффектами avidности, т.е. связыванием одного и того же антигена с несколькими молекулами того же антигена, в данном случае GM-CSF или рецептора GM-CSF. Несколько моновалентных моноспецифических форм фрагментов антител были описаны выше (например, scFv, Fv, VHH или однодоменное антитело). Мультивалентные мультиспецифические, в частности бивалентные биспецифические, формы антитела могут включать целый IgG, в котором одно связывающееся плечо связывается с GM-CSF/рецептором GM-CSF примата, в то время как другое связывающееся плечо связывается с другим антигеном, отличным от GM-CSF/рецептора GM-CSF. Еще одна мультивалентная мультиспецифическая, в частности бивалентная биспецифическая, форма предпочтительно может представлять собой человеческое, одноцепочечное биспецифическое антитело, т.е. рекомбинантную конструкцию человеческого антитела, содержащую два scFv-элемента, как описано выше, соединенных в одну непрерывную полипептидную цепь коротким вставленным полипептидным спейсером, как правило, известным в данной области (см., например WO 99/54440 для анти-CD19×анти-CD3 биспецифического одноцепочечного антитела). Здесь одна часть scFv биспецифического одноцепочечного антитела, содержащаяся в биспецифическом одноцепочечном антителе, специфически связывается с GM-CSF/рецептором GM-CSF, как указано выше, в то время как соответствующая другая часть scFv этого биспецифического одноцепочечного антитела связывает другой антиген, определенный как имеющий терапевтический эффект.

В соответствии с еще одним воплощением могут быть получены производные антител или их функциональных фрагментов, например с органическим полимером, например с одной или более моле-

кулами полиэтиленгликоля ("PEG") и/или поливинилпирролидона ("PVP"). Как известно специалистам в данной области техники, такие производные могут быть полезными в модулировании фармакодинамических свойств антител или их функциональных фрагментов. Особенно предпочтительными являются молекулы ПЭГ, полученные в виде производного ПЭГ-малеимида, что позволяет осуществлять конъюгацию с антителом или его функциональным фрагментом сайт-специфическим образом через сульфгидрильную группу цистеина аминокислоты. Из них особенно предпочтительными являются 20 и/или 40 кДа PEG-малеимид в форме разветвленной или прямой цепи. Может быть особенно полезно увеличивать эффективную молекулярную массу небольших фрагментов человеческих анти-GM-CSF антител, таких как фрагменты scFv, путем связывания последнего с одной или более молекулами ПЭГ, особенно ПЭГ-малеимида.

Антитела по настоящему изобретению также включает "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остаток цепи(ей) идентичен(ы) или гомологичен(ы) соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют нужную биологическую активность (патент US 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес, включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности варибельного домена, происходящие из примата, не являющегося человеком (например, из марышковых, обезьяны и т.д.) и последовательностей человеческой константной области.

"Гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающиеся последовательности антител) главным образом человеческих последовательностей, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки гиперварибельной области (включая CDR) реципиента заменены остатками гиперварибельной области вида, не являющегося человеком (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, обладающие нужными специфичностью, аффинностью и потенциалом. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) участка Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, не происходящими из человека. Кроме того, "гуманизированные антитела", при использовании здесь, также могут включать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Эти модификации сделаны для дополнительного усовершенствования и оптимизации характеристик антител. Оптимально, гуманизированное антитело также включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Подробности см. в Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Struct. Biol., 2:593-596 (1992).

Используемая в данном описании нумерация аминокислотных остатков или положений GM-CSF человека и примата, не являющегося человеком, относится к зрелому GM-CSF, т.е. GM-CSF без его аминокислотной сигнальной последовательности из 17 остатков (общая длина зрелого, описанного выше GM-CSF человека и примата, не являющегося человеком, составляет 127 аминокислот). Последовательность GM-CSF человека и гиббона выглядит следующим образом:

SEQ ID NO: 49

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EWISEMFDLQ  
EPTCLQTRLE LYKQGLRGS L TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

Последовательность GM-CSF некоторых представителей семейства макак, таких как, например, макак-резус и яванский макак, выглядит следующим образом:

SEQ ID NO: 50

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNKTV  
EWISEMFDLQ EPSCQTRLE LYKQGLQGS L TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP  
TPETSCATQI ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

Последовательность человеческого GM-CSF также показана в SEQ ID NO: 57. GM-CSF гиббона также показан в SEQ ID NO: 58:

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EWISEMFDLQ  
EPTCLQTRLE LYKQGLRGS L TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

(SEQ ID NO: 57 и 58)

Последовательность GM-CSF некоторых представителей семейства макак, таких как, например, макак-резус (SEQ ID NO: 59) и яванский макак (SEQ ID NO: 60), также выглядит следующим образом:



APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARLLNLSR DTAAEMNKTV EVVSEMF~~DLQ~~  
 EPSCLQTRLE LYKQGLQGSL TKLKGPLIMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
 ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE  
 (SEQ ID NO: 59 и 60)

Минимальный эпитоп, преимущественно прерывистый эпитоп, как описано в данном описании изобретения, связываемый антителом, предпочтительно человеческим моноклональным антителом (или его функциональным фрагментом), показан выше в последовательности(ях) GM-CSF жирным шрифтом.

В соответствии с предпочтительным воплощением, соединение, нейтрализующее GM-CSF, представляет собой антитело (предпочтительно человеческое моноклональное антитело) или его функциональный фрагмент, который связывается с GM-CSF. Более предпочтительно он связывается с эпитопом GM-CSF, который предпочтительно содержит аминокислоты 23-27 (RLLN) и/или аминокислоты 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL). Эти участки аминокислотных последовательностей указаны в вышеприведенной последовательности GM-CSF жирным шрифтом. Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене или мишени (например, GM-CSF), с которым соединение, такой как антитело или его функциональный фрагмент, специфически связывается. Следует понимать, что указанное связывание/взаимодействие определяет "специфическое распознавание". "Эпитопы" могут быть образованы как соседними аминокислотами, так и несоседними аминокислотами, становящимися сопредельными при третичном фолдинге белка. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, где аминокислотная первичная последовательность содержит распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, чаще по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например от примерно 8 до примерно 10 аминокислот или более, в уникальной последовательности. В контексте настоящего изобретения предпочтительно, чтобы GM-CSF эпитоп представлял собой прерывистый эпитоп. В случае, когда антитело связывается с обоими участками последовательности 23-27 и 65-77, эпитоп может называться "прерывистый". Во вторичной структуре человеческого GM-CSF аминокислоты 15-35 расположены в спирали А, в то время как остатки, соответствующие положениям 65-77, являются частью петлеобразной структуры, расположенной между спиралями С и D. Трехмерная модель складывания молекулы показывает тесную пространственную близость этих участков друг к другу (см. также WO 2006/111353). При использовании в данном описании изобретения термин "прерывистый эпитоп" следует понимать как по меньшей мере два несмежных участка аминокислотной последовательности внутри данной полипептидной цепи, здесь зрелого GM-CSF человека и примата, не являющегося человеком, которые совместно и специфически связываются антителом. В соответствии с этим определением такое одновременное специфическое связывание может быть связыванием полипептида GM-CSF в линейной форме. Здесь можно представить, что полипептид зрелого GM-CSF образует расширенную петлю, в одной области которой две последовательности, указанные жирным шрифтом выше, выстраиваются в одну линию, например, более или менее параллельно и в непосредственной близости друг от друга. В таком состоянии они специфически и одновременно связываются фрагментом антитела. В соответствии с этим определением одновременное специфическое связывание двух участков последовательности зрелого GM-CSF, указанного выше, может также принять форму связывания антитела с конформационным эпитопом. В данном случае зрелый GM-CSF уже образовал свою третичную конформацию, которая обычно существует *in vivo*. В этой третичной конформации полипептидная цепь зрелого GM-CSF складывается таким образом, чтобы привести два участка последовательности, указанные выше, в пространственную близость, например, на внешней поверхности определенной области зрелого, сложенного GM-CSF, где они потом распознаются благодаря своей трехмерной конформации в контексте окружающих полипептидных последовательностей.

В еще одном предпочтительном воплощении указанный выше эпитоп или указанный выше прерывистый эпитоп GM-CSF дополнительно содержит:

аминокислоты 28-31 (LSRD), выделенные курсивом в указанных выше последовательностях GM-CSF человека и примата, не являющегося человеком;

аминокислоты 32-33 (TA), подчеркнутые в указанных выше последовательностях GM-CSF человека и примата, не являющегося человеком; и/или

аминокислоты 21-22 (EA), подчеркнутые в указанных выше последовательностях GM-CSF человека и примата, не являющегося человеком.

Предпочтительными человеческими моноклональными анти-GM-CSF антителами или их функциональными фрагментами являются те, которые конкретно раскрыты в WO 2006/111353 как SEQ ID NO: 1-48 и 52-56, представляющие аминокислотные последовательности участков, определяющих комплементарность (CDR) 1-3, тяжелой и легкой цепей, а также переменные области тяжелой и легкой цепей и полноразмерные тяжелые и легкие цепи.

Особенно предпочтительными являются анти-GM-CSF антитела или их функциональные фрагменты, содержащие последовательность CDR1 переменной области тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2 переменной области тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3 переменной области тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1; или содержащие последовательность CDR1 переменной области тяжелой цепи, как ука-









функциональные фрагменты, предпочтительно молекулы моноклональных антител человека и/или их функциональные фрагменты, которые являются особенно полезными в качестве веществ, нейтрализующих активность GM-CSF примата и человека. Антитела или их функциональные фрагменты согласно этим особенно предпочтительным воплощениям являются очень полезными по нескольким причинам.

Во-первых, они узнают GM-CSF примата и человека с высокой специфичностью. Другими словами, из смеси GM-CSF приматов с другими колониестимулирующими факторами приматов (например, G-CSF и M-CSF приматов) связывающие молекулы в соответствии с этими особенно предпочтительными воплощениями являются высокоселективными в отношении GM-CSF приматов, в то время как другие колониестимулирующие факторы в той же среде не узнаются. То же самое относится, с необходимыми поправками, к человеческому GM-CSF. Это означает, что антитело или его функциональный фрагмент согласно этим воплощениям при введении человеку будет, как ожидается, специфически связываться только с нужной мишенью и нейтрализовать ее, в то время как другие ненужные мишени не связываются и не нейтрализуются. В конечном счете, это приводит к высокой степени предсказуемости относительно терапевтического механизма действия *in vivo*.

Во-вторых, связывающие вещества в соответствии с этими особенно предпочтительными воплощениями связываются с GM-CSF примата и человека со значительной аффинностью. "Значительная аффинность" включает связывание с аффинностью примерно  $10^{-6}$  М ( $K_D$ ) или сильнее. Предпочтительно связывание считается существенным (или высоким, или специфическим), когда аффинность связывания составляет примерно  $10^{-12}$ - $10^{-8}$  М,  $10^{-12}$ - $10^{-9}$  М,  $10^{-12}$ - $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$ - $10^{-8}$  М, предпочтительно примерно  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  М. Соответственно, связывающее вещество по изобретению предпочтительно имеет  $K_D$  в пределах этого диапазона. Учитывая тот факт, что значения  $K_D$  от примерно  $4 \times 10^{-9}$  М до таких низких, как примерно  $0,04 \times 10^{-9}$  М, где последнее значение соответствует примерно 40 пМ, наблюдались для молекул антител, описанных здесь, предпочтительно, чтобы молекулы антител по изобретению имели  $K_D$  в пределах этого диапазона. Однако также предпочтительно, чтобы молекулы антител по изобретению имели  $K_D$ , как описано здесь выше. Так как кинетическая скорость ассоциации таких молекул в водной среде в значительной степени сдерживается диффузией и, следовательно, не может быть улучшена за пределы того, что позволяют локальные условия диффузии в физиологических условиях, низкое значение  $K_D$  связано, главным образом, с кинетической скоростью диссоциации  $k_{off}$ , которая для связывающегося антитела с самой высокой аффинностью составляет примерно  $10^{-5}$  с<sup>-1</sup>. Это означает, что когда образуется комплекс между человеческим моноклональным антителом или его функциональным фрагментом согласно любому из этих воплощений, с одной стороны, и GM-CSF, с другой стороны, он не легко или по меньшей мере не быстро диссоциирует. Для связывающих молекул, предназначенных для нейтрализации биологической активности, эти характеристики очень полезны, так как необходимый нейтрализующий эффект обычно длится только до тех пор, пока молекула, биологическая активность которой должна быть нейтрализована (здесь GM-CSF примата и человека), остается связанной нейтрализующей связывающейся молекулой. Таким образом, нейтрализующая молекула, которая остается связанной с наметенной мишенью в течение длительного времени, будет продолжать нейтрализовать в течение соответственно длительного времени.

Высокая аффинность связывания антител или их функциональных фрагментов с GM-CSF приматов и человека имеет дополнительное преимущество. Обычно антитела или их функциональные фрагменты удаляются из кровотока пациента зависимым от размера образом, при этом меньшие молекулы выводятся и элиминируются раньше, чем более крупные. Так как размер комплекса из двух полипептидов - антитела или фрагмента антитела и связанного GM-CSF - очевидным образом больше, чем одно антитело, низкое значение  $k_{off}$ , упомянутое выше, оказывает эффект, выражающийся в том, что терапевтическое нейтрализующее вещество выводится и элиминируется из организма пациента медленнее, чем в случае, когда оно не связано с GM-CSF. Таким образом, увеличивается не только величина нейтрализующей активности, но также и продолжительность ее действия *in vivo*.

Нейтрализующая активность, определенная для связывающих веществ согласно вышеприведенным воплощениям, является неожиданно высокой. Как описано более подробно ниже, нейтрализующую активность GM-CSF измеряли *in vitro*, используя анализ ингибирования роста TF-1 (Kitamura, T. et al. (1989). J. Cell Physiol. 140, 323-34). В качестве показателя нейтрализующего потенциала измеряли значения  $IC_{50}$ , где  $IC_{50}$  представляет собой концентрацию антитела или его функционального фрагмента согласно любому из этих воплощений, необходимую для того, чтобы вызвать полумаксимальное ингибирование пролиферации клеток TF-1. Для человеческих моноклональных анти-GM-CSF антител или их функциональных фрагментов, описанных выше, было определено значение  $IC_{50}$ , равное примерно  $3 \times 10^{-10}$  М или примерно 0,3 нМ. Таким образом, связывающие молекулы являются очень сильными агентами, нейтрализующими активность GM-CSF приматов и человека.

Другие примеры нейтрализующих анти-GM-CSF антител представляют собой человеческое антитело E10 и человеческое антитело G9, описанные в Li et al., (2006), PNAS, 103(10):3557-3562. E10 и G9 представляют собой антитела класса IgG. E10 имеет аффинность связывания GM-CSF 870 пМ, и G9 имеет аффинность связывания GM-CSF 14 пМ. Оба антитела являются специфичными в отношении связыва-

вания с человеческим GM-CSF и демонстрируют сильную нейтрализующую активность, которую оценивали с помощью анализа пролиферации клеток TF-1. Другими примерами являются человеческие анти-GM-CSF антитела, раскрытые в WO 2006/122797.

GM-CSF-антагонисты или нейтрализующие вещества, которые представляют собой антитела к рецептору GM-CSF, также можно использовать в настоящем изобретении. Такие антагонисты GM-CSF включают антитела к альфа- или бета-цепи рецептора GM-CSF. Антитело к рецептору GM-CSF, используемое в изобретении, может находиться в любой форме антитела, как поясняется выше, например в интактной, химерной, моноклональной, поликлональной, в форме фрагмента или производного антитела, одноцепочечного, гуманизированного, полученного посредством гуманиринга, и т.п.. Примеры антител к рецептору GM-CSF, например нейтрализующие высокоаффинные антитела, подходящие для применения в изобретении, известны в данной области (см., например, патент US 5747032 и Nicola et al., Blood, 82:15 1724, 1993).

Дополнительные последовательности для подходящих антител представлены в заявках и включены посредством ссылок во всей их полноте. Анти-GM-CSF антитела представлены в WO 2006/122797, WO 2007/049472, WO 2007/092939, WO 2009/134805, WO 2009/064399, WO 2009/038760. Антитела к рецептору GM-CSF представлены в WO 2007/110631.

Таким образом, анти-GM-CSF антитела или их функциональные фрагменты демонстрируют высокую степень селективности в отношении нужного антигена, связывают этот антиген очень сильно в течение длительного времени и демонстрируют высокую нейтрализующую активность в течение длительного времени, пока они остаются связанными. В то же время длительная стойкость комплекса связывающего вещество-антиген замедляет элиминацию этого связывающего вещества из организма, тем самым продлевая продолжительность нужного терапевтического эффекта *in vivo*. Те же самые характеристики предпочтительно также применимы к антителам, которые распознают рецептор GM-CSF, как описано выше.

Композиция по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию. В соответствии с настоящими воплощениями термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции для введения пациенту, предпочтительно пациенту-человеку. Фармацевтические композиции или препараты, как правило, находятся в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и, следовательно, могут быть введены субъекту для терапевтического применения, как описано в данном документе. Как правило, фармацевтическая композиция содержит подходящие (т.е. фармацевтически приемлемые) составы носителей, стабилизаторов и/или эксципиентов. В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция представляет собой композицию для парентерального, трансдермального, внутрисосудового, внутриартериального, интратекального и/или интраназального введения или для непосредственной инъекции в ткани. В частности предполагается, что указанную композицию вводят пациенту посредством инфузии или инъекции. Введение подходящих композиций может быть осуществлено разными способами, например путем внутривенного, внутривнутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, местного или внутридермального введения. Композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области и включают забуференные солевые растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы увлажнителей, стерильные растворы, липосомы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, могут быть приготовлены посредством хорошо известных традиционных способов.

В соответствии с настоящими воплощениями термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, нейтрализующего GM-CSF, которое является эффективным для лечения заболеваний, связанных с GM-CSF, таких как воспалительные и аутоиммунные заболевания.

Предпочтительными дозами и предпочтительными способами введения являются такие, когда после введения соединения, нейтрализующего GM-CSF, присутствует в крови в эффективных дозировках. Схему введения можно скорректировать, наблюдая за болезненными состояниями и анализируя сывороточные уровни соединения, нейтрализующего GM-CSF, в лабораторных испытаниях, с последующим удлинением интервала введения, например от двух раз в неделю или одного раза в неделю до одного раза в две недели, одного раза в три недели и т.п., или, альтернативно, с уменьшением интервала введения соответствующим образом.

Фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Режим приёма препарата определяется лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в медицине, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая величину пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые лекарственные средства.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. Парентеральные носители включают

раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или жирные масла. Внутривенные носители включают жидкие и питательные подпитки, электролитные подпитки (такие как подпитки на основе декстрозы Рингера) и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п. Кроме того, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может включать белковоподобные носители, такие как, например, сывороточный альбумин или иммуноглобулин, предпочтительно человеческого происхождения. Предполагают, что фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать, в дополнение к вышеописанным соединениям, дополнительные биологически активные агенты в зависимости от предполагаемого применения этой фармацевтической композиции. Такими агентами могут быть лекарственные средства, действующие на желудочно-кишечный тракт, лекарственные средства, действующие в качестве цитостатиков, лекарственные средства, предотвращающие гиперурикемию, лекарственные средства, ингибирующие иммунные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные средства, модулирующие воспалительную реакцию, лекарственные средства, действующие на систему кровообращения, и/или агенты, такие как цитокины, известные в данной области техники.

Чтобы проанализировать эффект соединения, нейтрализующего GM-CSF, например, при ревматоидном артрите (РА), критерии оценки могут быть выбраны, например, на основании фармакокинетики, иммуногенности и способности улучшить клинические признаки и симптомы ревматоидного артрита, определенные с помощью DAS28, ACR20/50/70 и/или критериев ответа EULAR (Европейская противоревматическая лига), МРТ-визуализации синовита и отека кости, а также результатов, сообщенных пациентом. ACR (критерий Американской коллегии ревматологов) представляет собой показатель, обобщающий уменьшение числа болезненных и опухших суставов, улучшение по шкале боли, оценку улучшения, сделанную пациентами и врачами, и некоторые лабораторные маркеры. ACR 20 описывает процент участников исследования, достигших 20%-ного улучшения клинических признаков и симптомов, например 20%-ного уменьшения числа болезненных или опухших суставов, а также 20%-ного улучшения по трем другим релевантным для заболевания критериям.

Другой серьезной проблемой в разработке лекарственных средств, таких как фармацевтическая композиция по изобретению, является прогнозируемая модуляция фармакокинетических свойств. С этой целью устанавливают фармакокинетический профиль потенциального лекарственного средства, т.е. профиль фармакокинетических параметров, которые влияют на способность конкретного лекарственного средства лечить данное состояние. Фармакокинетические параметры лекарственного средства, влияющие на способность лекарственного средства лечить определенную нозологическую форму, включают, без ограничения ими, время полувыведения, объем распределения, печеночный пресистемный метаболизм и степень связывания сывороткой крови. На эффективность данного лекарственного средства может влиять каждый из указанных выше параметров. "Время полувыведения" означает время, за которое 50% введенного лекарственного средства элиминируется посредством биологических процессов, например метаболизма, выделения и т.д. Под "печеночным пресистемным метаболизмом" подразумевают предрасположенность лекарственного средства метаболизироваться при первом контакте с печенью, т.е. во время его первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удерживания лекарственного средства различными компартментами организма, такими как, например, внутриклеточные и внеклеточные пространства, ткани и органы и т.д., и распределение лекарственного средства в этих компартментах. "Степень связывания сывороткой крови" означает предрасположенность лекарственного средства взаимодействовать и связываться с белками сыворотки крови, такими как альбумин, что приводит к снижению или потере биологической активности лекарственного средства.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, латентный период (Tlag), Tmax, скорости всасывания и/или Cmax для данного количества введенного лекарственного средства. "Биодоступность" означает количество лекарственного средства в крови "Латентный период" означает временную задержку между введением лекарственного средства и его обнаружением и возможностью измерения в крови или плазме. "Tmax" представляет собой время, за которое достигается максимальная концентрация лекарственного средства в крови, и всасывание определяется как движение лекарственного средства из места введения в системный кровоток, и "Cmax" концентрацию в крови, максимально получаемую с данным лекарственным средством. Время, необходимое для достижения концентрации лекарственного средства в крови или ткани, необходимой для его биологического эффекта, зависит от всех параметров.

Используемый в данном описании термин "токсичность" относится к токсическим действиям лекарственного средства, проявляющихся в нежелательных явлениях или в тяжелых нежелательных явлениях. Эти побочные явления могут относиться к отсутствию переносимости лекарственного средства в целом и/или к отсутствию местной переносимости после введения. Токсичность также может включать тератогенные или канцерогенные эффекты, вызванные лекарственным средством.

Используемые в данном описании термины "безопасность", "безопасность in vivo" или "переносимость" определяют введение лекарственного средства без индукции серьезных нежелательных явлений сразу после введения (местная переносимость) и в течение более длительного периода применения ле-



карственного средства. "Безопасность", "безопасность in vivo" или "переносимость" можно оценивать, например, через регулярные промежутки времени в процессе лечения и последующего периода наблюдения. Измерения включают клиническую оценку, например, проявлений болезни в органах, а также контроль отклонений от нормы лабораторных показателей. Клинические оценки могут быть выполнены, и отклонения от нормальных данных записаны/закодированы в соответствии со стандартами NCI-CTC (оценочная шкала общих критериев токсичности Национального института исследования рака) и/или MedDRA (Медицинский словарь регулирующей деятельности). Проявления в органах могут включать такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и т.п., как указано, например, в Общих терминологических критериях нежелательных явлений v3.0 (CTCAE). Лабораторные параметры, которые могут быть проанализированы, включают, например, гематологию, клиническую химию, профиль коагуляции, анализ мочи и исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка, плазма, лимфоидная или спинно-мозговая жидкость, ликвор и т.п. Безопасность, таким образом, может быть оценена, например, путем физического обследования, методом визуализации (т.е. ультразвука, рентгена, компьютерной томографии, магнитно-резонансной визуализации (MRI)), других измерений с помощью технических устройств (например, электрокардиограммы), основных показателей состояния организма, путем измерения лабораторных показателей и регистрации нежелательных явлений. Используемый здесь термин "эффективная и нетоксичная доза" относится к переносимой дозе соединения, нейтрализующего GM-CSF, предпочтительно антитела, как описано здесь, которая является достаточно высокой, чтобы вылечить или стабилизировать интересующее заболевание без или по существу без значительных токсических эффектов. Такие эффективные и нетоксичные дозы можно определить, например, посредством исследования с повышением дозы, описанного в данной области, и они должны быть ниже дозы, индуцирующей тяжелые нежелательные побочные явления (дозолимитирующая токсичность, DLT).

Композиция по настоящему изобретению (иногда также упоминаемая здесь как "композиция веществ", "композиция" или "раствор") предпочтительно может находиться в различных физических состояниях, таких как жидкие, замороженные, лиофилизированные, подвергнутые сублимационной сушке, высушенные распылением и восстановленные композиции, где жидкая и замороженная композиции являются предпочтительными.

"Жидкая композиция", при использовании здесь, относится к композиции веществ, которые находятся в виде жидкости, характеризующейся свободным передвижением составляющих ее молекул между собой, но без тенденции к разделению при комнатной температуре. Жидкие композиции включают водную и неводную жидкость, причем предпочтительными являются водные композиции. Водная композиция представляет собой композицию, в которой растворителем или основным растворителем является вода, предпочтительно вода для инъекций (WFI). Растворение соединения, нейтрализующего GM-CSF, в композиции может быть гомогенным или гетерогенным, при этом предпочтительным является гомогенное, как описано выше.

Любая подходящая неводная жидкость может быть использована при условии, что она обеспечивает стабильность композиции по изобретению. Предпочтительно неводная жидкость представляет собой гидрофильную жидкость. Иллюстративные примеры подходящих неводных жидкостей включают глицерин; диметилсульфоксид (DMSO); полидиметилсилоксан (PMS); этиленгликоли, такие как этиленгликоль, диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, полиэтиленгликоль ("PEG") 200, PEG 300 и PEG 400; и пропиленгликоли, такие как дипропиленгликоль, трипропиленгликоль, полипропиленгликоль ("PPG") 425 и PPG 725.

"Смешанная водная/неводная жидкая композиция", при использовании здесь, относится к жидкой композиции, которая содержит смесь воды, предпочтительно WFI (вода для инъекций) и дополнительной жидкой композиции.

При использовании здесь, "состав" или "композиция" представляет собой смесь соединения, нейтрализующего GM-CSF (т.е. активного лекарственного средства/вещества) и дополнительных химических веществ и/или добавок, необходимых для медицинского продукта, которые предпочтительно находятся в жидком состоянии. Композиция по изобретению включает фармацевтическую композицию.

Приготовление композиции включает процесс, в котором разные химические вещества, в том числе активное лекарственное средство, объединяют с получением конечного медицинского продукта, такого как фармацевтическая композиция. Активным лекарственным средством композиции по изобретению является соединение, нейтрализующее GM-CSF.

В некоторых воплощениях соединение, нейтрализующее GM-CSF, для приготовления композиции является по существу чистым и/или по существу гомогенным (т.е. по существу не содержащим загрязняющих веществ, например белков и т.д., которые могут быть примесями, связанными с продуктом или с процессом приготовления). Термин "по существу чистый" означает композицию, содержащую по меньшей мере примерно 80%, предпочтительно примерно 90% по массе соединения, предпочтительно по меньшей мере примерно 95% по массе соединения, более предпочтительно по меньшей мере примерно 97% по массе соединения, или наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 98% по массе соединения, предпочтительно соединения в мономерном состоянии. Термин "по существу гомогенный"

означает композицию, содержащую по меньшей мере примерно 99% по массе соединения, предпочтительно соединения в мономерном состоянии, за исключением массы различных стабилизаторов и воды в растворе.

Используемый здесь термин "примерно" следует понимать как означающий, что могут быть отклонения от соответствующего значения или диапазона (такого как pH, концентрация, процент, молярность, число аминокислот, время и т.д.), которые могут составлять вплоть до 5%, вплоть до 10%, вплоть до 15% или включая 20% данного значения. Например, если композиция содержит примерно 5 мг/мл соединения, следует понимать, что это означает, что композиция может содержать от 4 до 6 мг/мл, предпочтительно от 4,25 до 5,75 мг/мл, более предпочтительно от 4,5 до 5,5 мг/мл и еще более предпочтительно от 4,75 до 5,25 мг/мл, с наиболее предпочтительным значением 5 мг/мл. При использовании здесь, интервал, который определен как "от X до Y", равен интервалу, который определен как "X-Y". Оба интервала, как правило, включают верхний предел и также нижний предел. Это означает, что, например, интервал "от 5 до 10 мг/мл" или "5-10 мг/мл" включает концентрацию 5, 6, 7, 8, 9 и 10 мг/мл, а также любое промежуточное значение.

"Стабильная" композиция представляет собой такую композицию, в которой находящееся в ней соединение, нейтрализующее GM-CSF, по существу сохраняет свою физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении и/или не демонстрирует значительных признаков агрегации, выпадения в осадок, фрагментации, деградации и/или денатурации по сравнению с контрольным образцом, предпочтительно при визуальном исследовании цвета и/или чистоты или при измерении с помощью рассеяния ультрафиолетового света или посредством эксклюзионной хроматографии. Различные дополнительные аналитические методы измерения стабильности белка доступны в данной области и рассмотрены в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993), например.

Используемый здесь термин "во время хранения" означает композицию, которую не используют немедленно после ее приготовления; вместо этого после ее приготовления ее упаковывают для хранения либо в жидкой форме, либо в замороженном состоянии, либо в сухой форме для последующего восстановления в жидкую форму или другую форму.

Предполагается, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, является предпочтительно стабильным, так как он по существу не образует агрегаты или невидимые невооруженным глазом/видимые частицы или фрагменты/продукты деградации (например, вследствие одной или более вышеуказанных причин) при хранении, и/или во время или после замораживания/размораживания, и/или во время или после воздействия напряжения сдвига (например, вследствие встряхивания или из-за стадий фильтрования). Соответственно, предпочтительно предусмотрено, что не более чем 10% соединения, нейтрализующего GM-CSF, более предпочтительно не более чем 8%, еще более предпочтительно не более чем 5%, особенно предпочтительно не более чем 2% относительно количества соединения, нейтрализующего GM-CSF, в начале хранения, или до выполнения одного или более циклов замораживания/размораживания, или до выполнения исследований встряхивания образуют агрегаты, частицы и/или фрагменты. Эта стабильность предпочтительно применима для временного диапазона по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца или по меньшей мере 3 месяца; предпочтительно по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев или по меньшей мере 6 месяцев; более предпочтительно по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев; еще более предпочтительно по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяца и наиболее предпочтительно по меньшей мере 30 месяцев, или по меньшей мере 36 месяцев, или по меньшей мере 48 месяцев, или по меньшей мере 54 месяца, или по меньшей мере 60 месяцев. Предпочтительные температуры хранения составляют вплоть до комнатной температуры (от примерно 20 до примерно 25°C), более предпочтительно примерно 2-8°C, наиболее предпочтительный временной диапазон составляет по меньшей мере 3 года или даже по меньшей мере 4 года. В некоторых воплощениях соединение, нейтрализующее GM-CSF, является стабильным при комнатной температуре в теплом климате (например, примерно при 30°C). Число циклов замораживания/размораживания, во время которых соединение является предпочтительно стабильным согласно вышеприведенным параметрам, составляет по меньшей мере один цикл, предпочтительно по меньшей мере 2, 3 или 4 цикла, более предпочтительно по меньшей мере 5, 6 или 7 циклов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 8, 9 или 10 циклов. Число суток встряхивания, например встряхивания во время транспортировки соединения, нейтрализующего GM-CSF, в течение которых соединение является предпочтительно стабильным согласно вышеприведенным параметрам (например, при температуре 5±3°C, см. также пример 12d) составляет по меньшей мере 1 сутки, предпочтительно по меньшей мере 2, 3 или 4 суток, более предпочтительно по меньшей мере 5, 6 или 7 суток, еще более предпочтительно по меньшей мере 8, 9, 10 или 11 суток и наиболее предпочтительно по меньшей мере 12, 13 или 14 суток.

В альтернативном варианте предусмотрено, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, предпочтительно является стабильным, если оно не образует димеры, олигомеры или фрагменты. Иными словами, стабильность соединения, нейтрализующего GM-CSF, можно определить по проценту мономерного белка в растворе, с низким процентом деградированного (например, фрагментированного), присутствующе-

го в виде частиц (например, видимых и/или невидимых невооруженным глазом частиц) и/или агрегированного белка. Например, композиция по изобретению, содержащая соединение, нейтрализующее GM-CSF, такое как антитело, может включать по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, особенно предпочтительно по меньшей мере 98% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% мономерного соединения, нейтрализующего GM-CSF.

Термин "агрегировать" означает физическое взаимодействие между молекулами белка, которое приводит к образованию ковалентных или нековалентных димеров или олигомеров (т.е. высокомолекулярных объектов, такие как тримеры или мультимеры), которые могут оставаться растворимыми. "Агрегат" также включает деградированный и/или фрагментированный белок. Размер агрегата, например растворимого агрегата, обычно составляет менее 1 мкм.

Термин "невидимая невооруженным глазом частица" означает физическое взаимодействие молекул белка (включая деградированный или фрагментированный белок), которое приводит к обратимому или необратимому образованию белковых частиц, размер которых составляет более 1 мкм и вплоть до примерно 100 мкм. Растворимые агрегаты и/или белковые молекулы (включающие деградированный или фрагментированный белок) могут соединиться с образованием невидимых невооруженным глазом частиц.

Размер "видимой частицы" обычно составляет более 100 мкм, и она может представлять собой либо видимую частицу из собственных молекул белка, например, образованную из более маленьких невидимых невооруженным глазом частиц, агрегатов или молекул белка (включая деградированный или фрагментированный белок), либо примесную видимую частицу, например, содержащую чужеродное вещество, например, из контейнера для хранения или устройства для доставки. Некоторые примесные или собственные частицы, происходящие из комбинированного продукта, такие как капельки силикона, представляют собой жидкости, а не частицы, но могут быть обнаружены в виде частиц в некоторых анализах.

Как упомянуто здесь выше, ряд различных аналитических методов может быть использован для обнаружения присутствия и уровня агрегатов в композиции, содержащей соединение, нейтрализующее GM-CSF. Они включают, без ограничения ими, например, нативный электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE), электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), время-пролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), капиллярный гель-электрофорез (CGE), эксклюзионную хроматографию (SEC), аналитическое ультрацентрифугирование (AUC), фракционирование в потоке под воздействием поля (FFF), скорость осаждения, УФ-спектроскопию, дифференциальную сканирующую калориметрию, турбидиметрию, нефелометрию, эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC), обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (RP-HPLC), tandemную масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) и tandemную RP-HPLC/ESI-MS, фракционирование в потоке под воздействием потока поля и статическое и/или динамическое рассеяние света. Эти методы могут быть использованы либо отдельно, либо в комбинации. Предпочтительно аналитические методы определения присутствия и уровней агрегатов и/или фрагментов в композиции, содержащей соединение, нейтрализующее GM-CSF, представляют собой эксклюзионную хроматографию, такую как SE-HPLC, аналитическое ультрацентрифугирование и фракционирование в потоке под воздействием асимметричного поля. Способ определения биологической активности соединения, нейтрализующего GM-CSF, представляющий собой, например, измерение степени связывания с (иммобилизованным) GM-CSF (или рецептором GM-CSF), представляет собой так называемый поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Общей проблемой композиций, содержащих белок, является необратимое накопление агрегатов с течением времени и при тепловом или сдвиговом напряжении. Как правило, когда агрегаты выпадают в осадок, они образуют большие частицы, которые легко обнаружить. Однако небольшие, нековалентно связанные растворимые агрегаты, которые часто являются предшественниками выпадающих в осадок больших частиц, труднее определить и количественно оценить. Таким образом, способы обнаружения и количественной оценки агрегации белка в белковой композиции должны быть основаны на типе оцениваемого агрегата.

Из приведенных выше методов предлагаемыми методами определения присутствия и/или количества растворимых, ковалентных агрегатов в белковой композиции являются: SEC/светорассеяние, SDS-PAGE, CGE, RP-HPLC/ESI-MS, FFF и AUC. Предложенными методами определения присутствия и/или количества нерастворимых, нековалентных агрегатов в белковой композиции являются SEC, PAGE, SDS-PAGE, CGE, FFF, AUC и динамическое светорассеяние. Предложенные методы определения присутствия и/или количества нерастворимых, нековалентных агрегатов в белковой композиции представляют собой УФ-спектроскопию, турбидиметрию, нефелометрию, микроскопию, AUC, фракционирование потока в асимметричном поле и динамическое светорассеяние.

Невидимые невооруженным глазом частицы также могут образовываться из деградированного белка, агрегатов или более мелких невидимых невооруженным глазом частиц. Предложенными методами определения присутствия и/или количеств невидимых частиц являются светорассеяние, например стати-

ческое (например, посредством многоугольного лазерного светорассеяния) или динамическое (например, с помощью фотонной корреляционной спектроскопии), анализ траектории наночастиц (NTA, например от Malvern Instruments, Malvern, UK), светоблокировка или другие системы подсчета количества частиц в жидкости, такие как микроскопия, динамическая визуализация (визуализация микропотока, например Brightwell (Cell Biosciences, Ottawa, CA) или FLOWCAM® Image particle analyzer от Fluid Imaging Technologies (Yarmouth, ME) и т.д.), проточная цитометрия и вычисление электрического сопротивления (Coulter).

Кроме того, композиция по изобретению предпочтительно обеспечивает улучшенное продолжительное хранение, так что соединение, нейтрализующее GM-CSF, является стабильным во время хранения в жидкой или замороженной форме, предпочтительно в жидкой форме. Следует понимать, что используемая здесь фраза "долговременное" хранение означает, что композицию можно хранить в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 или 3 месяцев или более, в течение 6 месяцев или более и предпочтительно в течение 1 года и более, или даже 2, 3, или 4, или 5 лет и более. Также следует понимать, что долговременное хранение означает, что фармацевтическую композицию хранят либо при 2-8°C, либо при комнатной температуре, предпочтительно при 2-8°C, таким образом, композиция предпочтительно не теряет своей биологической активности в степени, описанной в данном описании, и/или не образуют агрегаты в степени, описанной в данном документе, и/или содержит мономеры в степени, описанной в данном документе. Анализы этих свойств описаны в другом месте.

В одном аспекте изобретения соединения, нейтрализующее GM-CSF, в композиции является стабильным, находясь в жидкой форме, в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев; по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 24 месяцев, по меньшей мере 36 месяцев, по меньшей мере 48 месяцев, по меньшей мере 60 месяцев. Промежуточные диапазоны для указанных выше периодов времени также считаются частью этого изобретения, например 9 месяцев и т.д. Кроме того, предполагается, что включены диапазоны значений с использованием комбинации любых из вышеперечисленных значений в качестве верхней и/или нижней границы. Предпочтительно композиция является стабильной при комнатной температуре (примерно 20-25°C) в течение по меньшей мере 1 месяца, и/или стабильной примерно при 2-8°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или более предпочтительно стабильной примерно при 2-8°C в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 4 лет или даже по меньшей мере 5 лет.

Другой важный аспект стабильности заключается в том, что соединение, нейтрализующее GM-CSF, в композиции по изобретению сохраняет свою биологическую активность или эффективность в течение времени хранения и в условиях хранения, особенно при температуре хранения и возможных изменениях температуры. Активность или эффективность, например, отражает сама нейтрализующая способность соединения (которую можно измерить в клеточных анализах, как описано здесь выше) или способность соединения, нейтрализующего GM-CSF, связываться с GM-CSF или с рецептором GM-CSF. Аффинность связывания можно определить с помощью SPR или других методов, хорошо известных в данной области, например анализа Viacore или анализа Scatchard.

Композицию по изобретению готовят путем добавления к соединению, нейтрализующему GM-CSF, как описано здесь, например, в водном растворе буфера, регулятора тоничности и одного или более поверхностно-активных веществ, аминокислот, антиоксидантов и/или хелатирующих агентов, где поверхностно-активные вещества являются предпочтительными. Специалистам в данной области техники понятно, что комбинирование различных компонентов для включения в композицию можно осуществить в любом подходящем порядке. Например, буфер может быть добавлен первым, в промежутке или последним, регулятор тоничности может быть добавлен первым, в промежутке или последним, и один или более поверхностно-активных веществ, аминокислот, антиоксидантов и/или хелатирующих агентов также могут быть добавлены первыми, в промежутке или последними. Специалисту также понятно, что некоторые из этих реагентов могут быть несовместимыми в некоторых комбинациях и, соответственно, должны быть легко заменены другими реагентами со сходными свойствами, но совместимыми в нужной смеси.

В предпочтительном аспекте изобретения композиция содержит буфер. Используемый здесь термин "буфер" или "буферный агент" включает такие агенты, которые поддерживают значение pH в необходимом диапазоне. Буфер представляет водный раствор, состоящий из смеси слабой кислоты и сопряженного с ним основания, или слабого основания и сопряженной с ним кислоты. Он обладает тем свойством, что pH раствора незначительно меняется при добавлении небольшого количества сильной кислоты или основания. Буферные растворы используют как средства поддержания почти постоянного значения pH в различных химических применениях. В целом, буфер при использовании в композиции по изобретению предпочтительно стабилизирует соединение, нейтрализующее GM-CSF.

"Аминокислотные буферы", при использовании здесь, включают, например, аминокислотное основание, например гистидин и его сопряженную соль. Примером аминокислотного буфера является гистидин/гистидина хлорид. Этот пример предпочтительно применяется в настоящем изобретении.

Предпочтительное значение pH композиции, как описано здесь, может быть выбрано из следующих

диапазонов: от примерно 4 до примерно 10, предпочтительно от примерно 4 до примерно 6, или от примерно 5 до примерно 7, более предпочтительно от примерно 5,5 до примерно 6,5. Наиболее предпочтительно рН составляет примерно или точно 5,8. Соответственно, предпочтительно используется буфер, который поддерживает значение рН раствора 5-7. Термин "примерно" при использовании в контексте значения/диапазона рН предпочтительно означает числовое значение с диапазоном  $\pm 20\%$  от указанного значения. Когда рН фармацевтической композиции установлено на или находится вблизи физиологического уровня, пациент испытывает максимальный комфорт при ее введении. Следует понимать, что рН может быть отрегулирован при необходимости, чтобы максимизировать стабильность и растворимость соединения, нейтрализующего GM-CSF, в конкретной композиции, и, как таковое, значение рН за пределами физиологического диапазона, но все еще предпочтительно переносимое пациентом, входит в объем настоящего изобретения.

Неограничивающие примеры буферов, которые могут быть использованы в композиции, описанной здесь, включают гистидин, сукцинат, глюконат, цитрат, аргинин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, Tris (триметамол), Bis-Tris, MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновую кислоту), ACES (N-(2-ацетиламино)-2-аминоэтансульфоновую кислоту), TES (2-[(2-гидрокси-1,1-бис-(гидроксиметил)этил)амино]этансульфоновую кислоту), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновую кислоту), EPPS (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновую кислоту), этилендиамин, фосфорную кислоту, малеиновую кислоту/фосфат, 2-морфолиноэтансульфоновую кислоту (MES), фосфат, ацетат и диэтаноламин.

Предпочтительные буферы представляют собой гистидиновый, ацетатный и цитратный буферы. Более предпочтительно в композиции по изобретению применяют гистидиновый буфер, предпочтительно имеющий рН от 5 до 7, более предпочтительно рН от 5,5 до 6,5, еще более предпочтительно рН 5,8. Буферы, используемые в изобретении, хорошо известны в данной области техники, изготавливаются известными способами и имеются в продаже. В некоторых воплощениях рН буфера регулируют без помощи гидроксида натрия (0 мМ NaOH). В одном воплощении буфер представляет собой смесь аминокислоты и ее соли, например смесь гистидина и соли гистидина, которые могут быть предварительно отмерены в такой пропорции, что во время приготовления буфера никакой регулировки рН отдельной кислотой или основанием не требуется.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит гидроксид натрия (NaOH). В конкретных воплощениях композиция содержит 1-200 мМ, или менее 50 мМ, менее 40 мМ, менее 35 мМ, менее 30 мМ, менее 25 мМ, менее 20 мМ или менее 15 мМ, например 10 мМ NaOH или менее, например 5 или 1 мМ гидроксида натрия.

В дополнение к соединению, нейтрализующему GM-CSF, и буферу, композиция по изобретению также может содержать другие вещества, которые включают, без ограничения ими, стабилизирующие агенты (стабилизаторы).

Соответственно, в предпочтительном аспекте композиция содержит стабилизатор, который также может действовать, как регулятор тоничности. Термин "стабилизирующий агент" относится к агенту, который улучшает или иным образом повышает стабильность композиции, в частности соединений, нейтрализующих GM-CSF. Стабилизирующий агент, который представляет собой регулятор тоничности, может представлять собой невосстанавливающий сахар, сахарный спирт или их комбинацию. Регуляторы тоничности в жидких композициях по настоящему изобретению гарантируют, что тоничность, т.е. осмолярность, раствора является по существу такой же, как в нормальных физиологических жидкостях, и, таким образом, предотвращает набухание после введения или быстрое поглощение композиции из-за разной концентрации ионов в композиции и физиологических жидкостях. Как правило, природа композиции, описанной здесь, является такой, что осмолярность композиции составляет от примерно 240 до примерно 500 мОсмоль/кг, более предпочтительно от примерно 300 до примерно 450 мОсмоль/кг, еще более предпочтительно от примерно 350 до примерно 450 мОсмоль/кг, наиболее предпочтительно примерно 400 мОсмоль/кг.

Предпочтительно стабилизирующий агент/регулятор тоничности может представлять собой один или более из невосстанавливающего сахара, такого как сахароза или трегалоза, или один или более из сахарных спиртов, таких как маннит или сорбит, а также предпочтительными являются комбинации невосстанавливающих сахаров и сахарных спиртов. В некоторых воплощениях концентрация стабилизирующего агента/регулятора тоничности в композиции выбрана из следующих диапазонов: от 1 до 15% (мас./об.), от 2 до 10% (мас./об.), от 3 до 8% (мас./об.), от 4 до 6,5% (мас./об.), от 4,5 до 6%, (мас./об.). В некоторых воплощениях концентрация составляет примерно 5-6% (мас./об.). Предпочтительным стабилизатором/регулятором тоничности, используемым в композиции по изобретению, является сорбит предпочтительно в количестве 5% (мас./об.).

В предпочтительных воплощениях композиция, описанная здесь, содержит один или более дополнительных эксципиентов. Предпочтительно эксципиент выбран из группы, состоящей из поверхностно-активных веществ, аминокислот, антиоксидантов, хелатирующих агентов и их комбинаций.

К композиции по изобретению могут быть добавлены эксципиенты, также называемые химическими добавками, совместно растворенные вещества или со-растворители, которые предпочтительно стабили-

лизируют соединения, нейтрализующие GM-CSF, находящиеся в растворе (а также в высушенной или замороженной форме). Предпочтительно эксципиенты вносят вклад в стабильность соединений, нейтрализующих GM-CSF, но следует понимать, что эксципиенты могут иным образом вносить вклад в физические, химические и биологические свойства композиции. Эксципиенты хорошо известны в данной области техники, изготавливаются известными способами и имеются в продаже.

Предпочтительным эксципиентом является поверхностно-активное вещество. Термин "поверхностно-активное вещество", как правило, включает такие агенты, которые защищают соединения, нейтрализующие GM-CSF, от напряжений, возникающих на границе воздух/раствор и раствор/поверхность. Эти поверхностные напряжения могут индуцировать агрегацию белка и образование частиц, что приводит к недопустимому качеству продукта. Примерами поверхностного напряжения может быть контакт белка с 1) воздухом, 2) материалом укупоренной упаковки, таким как резиновый поршень, поршень, стекло, предварительно заполненные шприцы, 3) материалами, связанными с производством, такими как стальные резервуары, насосы и насосно-компрессорные трубы, 5) льдом, во время замораживания/размораживания и т.д. Добавление поверхностно-активных веществ к композициям уменьшает взаимодействие белка с гидрофобными поверхностями, включая границы жидкость/воздух, границы лед/жидкость, и межбелковые взаимодействия. Поверхностно-активные вещества снижают количество невидимых невооруженным глазом и видимых частиц, образующихся во время таких операций, как замораживание, смешивание, фильтрование и перекачивание насосом.

Примеры поверхностно-активных веществ включают, без ограничения ими, неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбат 80 (PS80) или полисорбат 20 (PS20) (полисорбат, обычно также известный под торговым наименованием TWEEN®, ICI Americas); полочсамеры (например, полочсамер 188); Тритон, додецилсульфат натрия (SDS); лаурилсульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-сульфобетаин, миристил-сульфобетаин, линолеил-сульфобетаин, стеарил-сульфобетаин, лаурил-саркозин, миристил-саркозин, линолеил-саркозин, стеарил-саркозин, линолеил-бетаин, миристил-бетаин, цетил-бетаин, лауроамидопропил-бетаин, кокамидопропил-бетаин, линолеамидопропил-бетаин, миристамидопропил-бетаин, пальмидопропил-бетаин, изостеарамидопропил-бетаин (лауроамидопропил), миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропил-диметиламин, натрия метилкокоил-, динатрий метилолеил-таурат; и серии Monaquat (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ.), полиэтиленгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, плуроники, PF68). Предпочтительно поверхностно-активное вещество, используемое в композиции, описанной здесь, выбрано из одного или более из группы, состоящей из полисорбата 80, полисорбата 20, полочсамеров и их комбинаций.

Количество добавленного поверхностно-активного вещества является таким, что он поддерживает агрегацию белка на приемлемом уровне, определенном путем использования, например, SEC-HPLC, а также снижает количество невидимых невооруженным глазом или видимых частиц, образующихся во время хранения, изготовления, замораживания/размораживания, транспортировки и т.д., измеренное посредством светоблокировки, микроскопии и систем подсчета частиц на основе динамической визуализации, такой как микропроточная визуализация или FlowCAM.

В некоторых воплощениях количество поверхностно-активного вещества в композиции определяют на основе критической концентрации агрегации (CAC). CAC представляет собой концентрацию, при которой поверхностно-активное вещество начинает взаимодействовать с белком. Измерения поверхностного натяжения, например, сделанные с помощью тензометра, могут быть нанесены на график, чтобы получить кривые, аналогичные фиг. 7. Концентрация поверхностно-активного вещества в первой точке скачкообразного изменения представляет собой CAC. В некоторых воплощениях количество поверхностно-активного вещества в композиции выше, чем CAC. В некоторых воплощениях количество поверхностно-активного вещества выше, чем CAC, но меньше, чем критическая концентрация мицеллообразования (CMC).

В предпочтительных воплощениях композиция по изобретению содержит одно или более поверхностно-активных веществ, выбранных из группы, состоящей из полисорбата 80, полисорбата 20, полочсамеров и их комбинаций в концентрациях от примерно 0,001 до примерно 1% (мас./об.) для концентраций белка, составляющих вплоть до 200 мг/мл.

В более предпочтительном воплощении отношение полисорбата 20 к белку составляет от примерно 0,01:1 до примерно 3:1, предпочтительно от примерно 0,05:1 до примерно 2:1, более предпочтительно от примерно 0,1:1 до примерно 1,5:1, еще более предпочтительно от примерно 0,1:1 до примерно 0,8:1 и наиболее предпочтительно от примерно 0,1:1 до примерно 0,2:1. Для концентрации белка, составляющей 80 мг/мл, концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,005 до примерно 0,15% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,1% (мас./об.), еще более предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,06% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,01% (мас./об.). Для концентрации белка, составляющей 150 мг/мл, концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,006 до примерно 0,25% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,18% (мас./об.), еще более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно

0,1% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,02% (мас./об.).

В другом воплощении соотношение полисорбата 20 к белку составляет от примерно 0,3:1 до примерно 3:1, предпочтительно от примерно 0,5:1 до примерно 2,0:1, более предпочтительно от примерно 0,5:1 до примерно 1,5:1, еще более предпочтительно от примерно 0,8:1 до примерно 1,2:1 и наиболее предпочтительно примерно 1:1. Для концентрации белка 80 мг/мл концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,02 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,03 до примерно 0,13% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,05 до примерно 0,08% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,07% (мас./об.). Для концентрации белка 150 мг/мл концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,04 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,06 до примерно 0,25% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 0,15% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,13% (мас./об.).

В другом более предпочтительном воплощении соотношение полисорбата 80 к белку составляет от примерно 0,01:1 до примерно 3:1, предпочтительно от примерно 0,05:1 до примерно 2:1, более предпочтительно от примерно 0,1:1 до примерно 1,5:1, еще более предпочтительно от примерно 0,1:1 до примерно 0,6:1 и наиболее предпочтительно от примерно 0,3:1 до примерно 0,6:1. Для концентрации белка 80 мг/мл, концентрация полисорбата 80 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,004 до примерно 0,14% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,1% (мас./об.), еще более предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,05% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,04% (мас./об.). Для концентрации белка, равной 150 мг/мл, концентрация полисорбата 80 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,26% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,2% (мас./об.), еще более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,08% (мас./об.), наиболее предпочтительно примерно 0,04% (мас./об.).

В другом воплощении отношение полисорбата 80 к белку составляет от примерно 0,3:1 до примерно 3:1, предпочтительно от примерно 0,5:1 до примерно 2,0:1, более предпочтительно от примерно 0,5:1 до примерно 1,5:1, еще более предпочтительно от примерно 0,8:1 до примерно 1,2:1 и наиболее предпочтительно примерно 1:1. Для концентрации белка 80 мг/мл концентрация полисорбата 80 составляет от примерно 0,02 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,04 до примерно 0,14% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,06 до примерно 0,09% (мас./об.), наиболее предпочтительно примерно 0,07% (мас./об.). Для концентрации белка, равной 150 мг/мл, концентрации полисорбата 80 составляет от примерно 0,04 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,06 до примерно 0,27% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 0,16% (мас./об.), наиболее предпочтительно примерно 0,13% (мас./об.).

Другие предпочтительные эксципиенты могут быть антиоксидантами или хелатирующими агентами. "Антиоксидант", при использовании здесь, представляет собой молекулу, способную замедлять или предотвращать окисление других молекул. Окисление представляет собой химическую реакцию, которая переносит электроны с вещества на окислительный агент. Антиоксиданты или хелатирующие агенты можно использовать, чтобы уменьшить эффекты окисления, вызванного добавлением поверхностно-активных веществ, таких как полисорбат 80 или полисорбат 20, которые в растворе могут образовывать перекиси. Антиоксиданты и/или хелатирующие агенты, такие как аскорбиновая кислота (витамин С), липоевая кислота, мелатонин, мочевиная кислота, каротины, ретинолы, токоферолы и токотриенолы, например  $\alpha$ -токоферол (витамин Е), убихинон (кофермент Q), метионин, цистеин, лимонная кислота, EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) или DTPA (диэтилентриаминпентауксусная кислота), могут быть добавлены к композиции. Более предпочтительно метионин, цистеин или лимонную кислоту добавляют в молярных соотношениях антиоксидант:поверхностно-активное вещество от примерно 3:1 до примерно 156:1 или в молярных соотношениях от примерно 1:1 до примерно 150:1 антиоксидант:белок. Более предпочтительно соотношение антиоксидант:белок составляет от примерно 2:1 до примерно 100:1, еще более предпочтительно от примерно 3:1 до примерно 20:1, наиболее предпочтительно от примерно 3:1 до примерно 8:1.

Другим эксципиентом, который можно добавлять в композицию для стабилизации белков, является аминокислота. Например, аминокислота, используемая в композиции по настоящему изобретению, выбрана из группы, состоящей из треонина, серина, пролина, аланина, валина, глутамина, метионина, цистеина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аргинина, глицина, гистидина, лизина, фенилаланина, лейцина, аспарагина, триптофана, тирозина и их комбинаций. Более предпочтительно аминокислоту выбирают из группы, состоящей из аргинина, треонина, серина, аланина, глутамина, метионина, глицина и их комбинаций.

Концентрации аминокислот, используемые в композициях по настоящему изобретению, предпочтительно находятся в диапазоне от примерно 10 до примерно 100 мМ, более предпочтительно от примерно 50 до примерно 100 мМ.

Примеры других эксципиентов включают, без ограничения ими, сахара/полиолы такие как сахароза, лактоза, глицерин, ксилит, сорбит, маннит, мальтоза, инозит, трегалоза, глюкоза; полимеры, такие как сывороточный альбумин (бычий сывороточный альбумин (BSA), человеческий SA или рекомбинантный

НА), декстран, PVA (поливиниловый спирт), гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), полиэтиленмин, желатин, поливинилпирролидон (PVP), гидроксиэтилцеллюлоза (HEC), гидроксиэтил крахмал (HES); неводные растворители, такие как: многоатомные спирты (например, PEG, этиленгликоль и глицерин) диметилсульфоксид (DMSO) и диметилформамид (DMF); и разнообразные эксципиенты, такие как фосфат калия, ацетат натрия, сульфат аммония, сульфат магния, сульфат натрия, триметиламина N-оксид, бетаин, ионы металлов (например, цинк, медь, кальций, марганец и магний), CHAPS (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфоната гидрат), монолаурат, 2-O-бета-манно-глицерат или любая комбинация указанного выше.

"Криопротекторы" включают вещества, которые обеспечивают стабильность замороженного белка в процессе производства, замораживания, хранения, обработки, распределения, восстановления или использования. В конкретном аспекте "криопротекторы" включают вещества, которые защищают белок от стрессов, индуцированных процессом замораживания. Криопротекторы могут иметь лиопротекторный эффект. Неограничивающие примеры криопротекторов включают сахара, такие как сахароза, глюкоза, трегалоза, маннит, сорбит, манноза и лактоза; полимеры, такие как декстран, гидроксиэтил крахмал, поливинилпирролидон (PVP) и полиэтиленгликоль; поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, PS-20 или PS-80); и аминокислоты, такие как глицин, аргинин, лейцин и серин. Как правило, используют криопротектор, демонстрирующий низкую токсичность в биологических системах.

Дисахарид, как описано здесь, может действовать как лиопротектор или криопротектор. "Лиопротекторы" включают вещества, которые предотвращают или снижают химическую или физическую нестабильность белка при лиофилизации и последующем хранении. В одном аспекте лиопротектор предотвращает или снижает химическую или физическую нестабильность при удалении воды из композиции во время процесса сушки. В другом аспекте лиопротектор стабилизирует белок, помогая поддерживать правильную конформацию белка посредством водородных связей.

Соответственно, в одном аспекте дисахарид, описанный здесь, может служить для стабилизации соединений, нейтрализующих GM-CSF, во время замораживания. Так как защита во время замораживания может зависеть от абсолютной концентрации дисахаридов (Carpenter et al., Pharm. Res. (1997), 14:969-975, для достижения максимальной стабильности могут быть необходимыми концентрации выше 5%.

В одном воплощении лиопротектор добавляют к композиции, описанной здесь. Используемый здесь термин "лиопротектор" включает агенты, которые обеспечивают стабильность белка во время лиофилизации или процесса дегидратации (первичные и вторичные циклы лиофилизации), путем обеспечения аморфной стеклообразной матрицы и путем связывания с белком посредством образования водородных связей, с заменой молекул воды, которые удаляются в процессе сушки. Это помогает поддерживать конформацию белка, свести к минимуму деградацию белка во время цикла лиофилизации и улучшить долговременную стабильность продукта. Лиопротектор добавляют к предварительно лиофилизованной композиции в "лиопротекторном количестве", это означает, что после лиофилизации соединений, нейтрализующих GM-CSF, в присутствии лиопротекторного количества лиопротектора эти соединения по существу сохраняют свою физическую и химическую стабильность и целостность при лиофилизации и хранении.

Неограничивающие примеры лиопротекторов включают сахара, такие как сахароза или трегалоза; аминокислоту, такую как однозамещенный глутамат натрия, глицин или гистидин; метиламин, такой как бетаин; лиотропную соль, такую как сульфат магния; полиол, такой как трех- или более атомные сахарные спирты, например арабит, ксилит, сорбит и маннит; полиэтиленгликоль; плуроники; и их комбинации. Предпочтительно лиопротекторы являются такими, как описано выше для стабилизаторов. Количество лиопротектора, добавленного к композиции, обычно представляет собой количество, которое не приводит к неприемлемой степени деградации/агрегации белка при лиофилизации белковой композиции.

Еще одним предпочтительным эксципиентом может быть объемобразующий агент. Используемый здесь термин "объемобразующий агент" включает агенты, которые обеспечивают структуру лиофилизованного продукта, не взаимодействуя непосредственно с фармацевтическим продуктом. В дополнение к обеспечению фармацевтически привлекательной лиофилизованной таблетки, объемобразующие агенты также могут придавать полезные свойства в отношении температуры коллапса, обеспечивая защиту при замораживании-размораживании и повышение стабильности белка при долговременном хранении. Неограничивающие примеры объемобразующих агентов включают маннит, глицин, лактозу и сахарозу. Объемобразующие агенты могут быть кристаллическими (такие как глицин, маннит или хлорид натрия) или аморфными (такие как декстран, гидроксиэтил крахмал) и, как правило, используются в белковых композициях в количестве от 0,5 до 10%.

Предпочтительно объемобразующий агент, используемый в композиции по изобретению, способствует образованию лиофилизованной таблетки, которая является эстетически приемлемой, однородной или механически прочной. Объемобразующие агенты также предпочтительно способствуют образованию открытопористой структуры и легкости и скорости восстановления. Объемобразующие агенты также предпочтительно уменьшают или предотвращают коллапс лиофилизованной таблетки, эвтектическое плавление или сохранение остаточной влажности. В другом аспекте объемобразующие агенты предпочтительно способствуют защите соединений, нейтрализующих GM-CSF, от стрессов (например,



физических и химических стрессов) и способствуют поддержанию активности белка.

В некоторых воплощениях композиция возможно может содержать консервант. "Консервант" представляет собой соединение, которое может быть добавлено к композициям по изобретению для уменьшения бактериальной активности. Добавление консерванта может, например, облегчить получение композиции для многократного использования (многодозовой). Примеры возможных консервантов включают октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид (смесь алкилдиметилбензиламмония хлоридов, в которых алкильные группы представляют собой длинноцепочечные соединения) и бензетония хлорид. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутиловый и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол. Наиболее предпочтительным консервантом здесь является бензиловый спирт.

Соответственно, в более предпочтительных воплощениях композиция по изобретению представляет собой жидкую, предпочтительно водную, композицию для длительного хранения, которая содержит от примерно 50 до примерно 200 мг/мл соединения, нейтрализующего GM-CSF, и буфер, выбранный из группы, состоящей из гистидинового, ацетатного и цитратного буфера, со значением pH от примерно 5 до примерно 7, и эта композиция может дополнительно содержать одно или более из сахарозы, трегалозы, маннита и/или сорбита в качестве стабилизатора/регулятора тоничности и одно или более из поверхностно-активных веществ, выбранных из группы, содержащей полисорбат 20, полисорбат 80 и полксамеры.

В особенно предпочтительных воплощениях композиция по изобретению является жидкой, предпочтительно водной, композицией для длительного хранения, которая содержит от примерно 50 до примерно 200 мг/мл соединения, нейтрализующего GM-CSF, более предпочтительно примерно 80 мг/мл или примерно 150 мг/мл, и гистидиновый буфер с концентрацией от примерно 20 до примерно 40 мМ, более предпочтительно примерно 30 мМ, со значением pH от примерно 5,5 до примерно 6,5, более предпочтительно 5,8, и эта композиция может дополнительно содержать от примерно 4 до примерно 6%, более предпочтительно примерно 5% (мас./об.) сорбита, а также полисорбата, например полисорбата 20 или полисорбата 80, в концентрации от примерно 0,005 до примерно 0,5% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,04% (мас./об.).

При использовании полисорбата 20 и концентрации белка, равной примерно 80 мг/мл в вышеуказанной предпочтительной композиции, концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,11% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,06% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,01% (мас./об.). Если используемая концентрация белка составляет примерно 150 мг/мл, концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,006 до примерно 0,25% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,18% (мас./об.), еще более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,1% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,02% (мас./об.).

В другом воплощении при использовании полисорбата 20 и концентрации белка примерно 80 мг/мл в вышеуказанной предпочтительной композиции концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,02 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,03 до примерно 0,13% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,05 до примерно 0,08% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,07% (мас./об.). Если используемая концентрация белка составляет примерно 150 мг/мл, концентрация полисорбата 20 составляет от примерно 0,04 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,06 до примерно 0,25% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 0,15% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,13% (мас./об.).

При использовании полисорбата 80 и концентрации белка примерно 80 мг/мл в вышеуказанной предпочтительной композиции концентрация полисорбата 80 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,004 до примерно 0,14% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,1% (мас./об.), еще более предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,05% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,04% (мас./об.). Если используемая концентрация белка оставляет примерно 150 мг/мл, концентрации полисорбата 80 составляет от примерно 0,001 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,007 до примерно 0,26% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,2% (мас./об.), еще более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 0,08% (мас./об.) и наиболее предпочтительно примерно 0,04% (мас./об.).

В другом воплощении при использовании полисорбата 80 и концентрации белка примерно 80 мг/мл в вышеуказанной предпочтительной композиции концентрация полисорбата 80 составляет от примерно 0,02 до примерно 0,2% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,04 до примерно 0,14% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,06 до примерно 0,09% (мас./об.), наиболее предпочтительно примерно 0,07% (мас./об.). Если концентрация используемого белка составляет примерно 150 мг/мл, концентрация полисорбата 80 составляет от примерно 0,04 до примерно 0,4% (мас./об.), предпочтительно от примерно 0,06 до примерно 0,27% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 0,16% (мас./об.), наиболее предпочтительно примерно 0,13% (мас./об.).

Кроме того, в одном воплощении настоящая композиция нейтрализующего анти-GM-CSF антитела или его функционального фрагмента содержит от примерно 80 до примерно 150 мг/мл нейтрализующего антитела, примерно 5% (мас./об.) сорбита, примерно 30 мМ L-гистидина, от примерно 0,02 до примерно 0,04% (мас./об.) полисорбата 80 и имеет рН примерно 5,8.

Кроме того, в одном воплощении настоящая композиция нейтрализующего анти-GM-CSF антитела или его функционального фрагмента содержит примерно 80 мг/мл нейтрализующего антитела, примерно 5% (мас./об.) сорбита, примерно 30 мМ L-гистидина, примерно 0,04% (мас./об.) полисорбата 80 и имеет рН примерно 5,8.

Кроме того, в одном воплощении настоящая композиция нейтрализующего анти-GM-CSF антитела или его функционального фрагмента содержит примерно 150 мг/мл нейтрализующего антитела, примерно 5% (мас./об.) сорбита, примерно 30 мМ L-гистидина, примерно 0,04% (мас./об.) полисорбата 80 и имеет рН примерно 5,8.

Следует понимать, что некоторые компоненты композиции могут быть заменены альтернативными вариантами, известными в данной области. Однако, специалисту в данной области техники также понятно, что включение определенных соединений может препятствовать использованию других компонентов, концентраций или способов получения композиции по причинам, которые включают, без ограничения ими, химическую совместимость, рН, тоничность и стабильность.

Для жидкой композиции по изобретению полезно иметь низкую и подходящую вязкость, которая является приемлемой для подкожного введения, например в готовом к применению устройстве. Следовательно, предпочтительной является вязкость композиции по изобретению ниже 20 мПа·с при скорости сдвига от примерно 50 до примерно 1000 [1/с] и при температуре примерно 20°C. Более предпочтительно вязкость составляет менее 15 мПа·с в указанных выше условиях.

В некоторых воплощениях вязкость и/или стабильность жидкой композиции по изобретению поддерживает в течение продолжительного времени низкое усилие при инъекции. Измерения усилия, например, для композиций в предварительно заполненных шприцах выполняют на приборе, таком как INSTRON® universal compression testing system (универсальная система анализа сжатия) (Norwood, MA), с приспособлением, которое позволяет тестирующему механизму удерживать шприцы. Описанные здесь композиции обеспечивают возможность подкожного введения с помощью как ручных, так и автоматических устройств (например, механических устройств). В одном воплощении усилие при инъекции представляет собой силу трения скольжения. В некоторых воплощениях сила трения скольжения меньше, чем 25 Н. В других воплощениях сила трения скольжения равна 0-20 Н, 2-15 Н или 4-11 Н. Время сохранения композицией низкого усилия при инъекции составляет по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 3-6 месяцев, 3-9 месяцев, 6-9 месяцев, 6-12 месяцев, 9-15 месяцев, 12-18 месяцев, 18-30 месяцев или 24-36 месяцев после помещения в шприц. Композицию можно хранить в холодильнике, например при 2-8 или 5°C, или при комнатной температуре, например при 18-25 или 25°C.

Как упоминалось в настоящем документе, данное изобретение, в общем, относится к обнаружению того, что добавление некоторых веществ к композиции, содержащей соединения, нейтрализующие GM-CSF, может уменьшить агрегацию и/или деградацию/фрагментацию этих соединений в композиции. Независимо от причины, вызывающей агрегацию или деградацию соединения, нейтрализующего GM-CSF, в композиции, добавление веществ, как описано в данном документе, уменьшает агрегацию/фрагментацию соединений, нейтрализующих GM-CSF, в композиции. В некоторых воплощениях добавление описанных веществ уменьшает агрегацию/деградацию в композиции, вызванную, например, хранением, воздействием повышенных температур, воздействием света, воздействием напряжения сдвига, рН и ионными условиями и любой их комбинацией.

Меры, обнаруженные авторами настоящего изобретения, могут быть использованы для уменьшения агрегации и/или деградации/фрагментации соединений, нейтрализующих GM-CSF, приготовленных, в частности, в жидкой и замороженной форме. Уменьшенная агрегация/фрагментация, таким образом, предпочтительно наблюдается в жидкой композиции. Предполагается, что пониженная агрегация/деградация может также наблюдаться при хранении непосредственно в жидкой форме для последующего использования, при хранении в замороженном состоянии и размораживании перед использованием, или полученной в сухой форме, например в лиофилизированной, высушенной на воздухе или в высушенной распылением форме, для последующего восстановления в жидкую форму или другую форму перед применением.

Таким образом, предполагается, что композиция, описанная в данном документе, может храниться любым способом, известным специалисту в данной области техники. Неограничивающие примеры включают охлаждение, замораживание, лиофилизацию и сушку распылением композиции, причем хранение посредством охлаждения является предпочтительным.

В некоторых случаях белковые композиции замораживают для хранения. Соответственно, желательно, чтобы композиция была относительно стабильной в таких условиях, включая циклы замораживания-размораживания. Одним способом определения такой пригодности композиции является воздей-

ствие на образец композиции по меньшей мере одного, например одного, трех, пяти, семи и вплоть до десяти циклов замораживания и размораживания (например, путем замораживания примерно при  $-80\pm 10^\circ\text{C}$  в течение ночи и быстрое размораживание при комнатной температуре или медленное размораживание на льду, например, в течение 6 ч), определение количества низкомолекулярных/укороченных (LMW) представителей и/или высокомолекулярных/агрегированных (HMW) представителей, которые накапливаются после циклов замораживания-размораживания, и сравнение их с количеством LMW- или HMW-представителей, присутствующих в образце перед процедурой замораживания-размораживания. Увеличение LMW- или HMW-представителей свидетельствует об уменьшении стабильности белка, хранящегося в виде части композиции. Эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (эксклюзионную HPLC) можно использовать для определения присутствия LMW и HMW-представителей.

Предпочтительно белковые композиции можно хранить в качестве жидкости. Соответственно, как описано здесь, желательно, чтобы жидкая композиция была стабильной в таких условиях, в том числе при различных температурах. Например, один из способов определения приемлемости композиции состоит в хранении образца композиции при нескольких температурах (таких как 2-8, 15, 20, 25, 30, 35, 40 и  $50^\circ\text{C}$ ) и определении количества HMW- и/или LMW-представителей, накапливающихся с течением времени. Чем меньше количества HMW- и/или LMW-представителей, которые накапливаются с течением времени, тем лучше условия хранения для композиции. Кроме того, профиль заряда белка можно определить посредством катионообменной-высокоэффективной жидкостной хроматографии (катионообменная HPLC). Альтернативно, композиции можно хранить после лиофилизации. Кроме того желательно, чтобы композиция была стабильной в условиях сдвигового напряжения. Один способ определения приемлемости композиции заключается во встряхивании композиции в приемнике на качалке, например на вертикальном шейкере, при нужной температуре (такой как 2-8, 15, 20, 25, 30, 35, 40 и  $50^\circ\text{C}$ , предпочтительно  $5\pm 3^\circ\text{C}$ ). Приемник (например, колбу) можно держать на шейкере в течение необходимого периода времени, например вплоть до 14 суток или более, против контроля, который хранят без встряхивания при такой же температуре. Сбор данных может быть осуществлен, например, через 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 и 14 суток. Количество низкомолекулярных представителей (LMW) и/или высокомолекулярных представителей (HMW), которые накапливаются после хранения при встряхивании, можно определить и сравнить с количеством LMW-представителей или HMW-представителей, присутствующих в образце без встряхивания. Увеличение LMW- или HMW-представителей указывает на уменьшение стабильности белка, который хранится как часть композиции. Эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (эксклюзионную HPLC) можно использовать для определения присутствия LMW- и HMW-представителей.

В некоторых случаях композицию сушат распылением и затем хранят. Для сушки распылением жидкую композицию переводят в аэрозольное состояние в присутствии потока сухого газа. Вода удаляется из капель композиции в поток газа, в результате чего получают сухие частицы лекарственной композиции. Эксципенты могут быть включены в композицию для того, чтобы (1) защитить белок во время дегидратации при сушке распылением, (2) защитить белок во время хранения после сушки распылением и/или (3) придать раствору свойства, подходящие для аэрозолизации. Способ аналогичен описанному выше для замораживания, за исключением того, что образец композиции сушат распылением вместо замораживания, восстанавливают в растворителе и восстановленную композицию анализируют на присутствие LMW-представителей и/или HMW-представителей. Увеличение LMW- или HMW-представителей в высушенном распылением образце по сравнению с соответствующим образцом композиции, которую не лиофилизировали, указывает на уменьшение стабильности в образце, высушенном распылением.

Термин "лиофилизированный" или "сублимированный" включает состояние вещества, которое было подвергнуто процедуре сушки, такой как лиофилизация, где по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, наиболее предпочтительно 98% влаги было удалено. Соответственно, используемый здесь термин "лиофилизация" относится к процессу, посредством которого вещество, которое нужно сушить, сначала замораживают с последующим удалением льда или замороженного растворителя посредством сублимации в вакуумной среде. Эксципент (например, лиопротектор) может быть включен в композиции, которые должны быть лиофилизированы, с тем чтобы повысить стабильность лиофилизованного продукта при хранении. Используемый здесь термин "восстановленная композиция" относится к композиции, которая получена посредством растворения лиофилизованной белковой композиции в растворителе, так что соединение, нейтрализующее GM-CSF, диспергировано в этом растворителе.

Используемый здесь термин "растворитель" представляет собой вещество, которое является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и является полезным для приготовления жидкой композиции, такой как композиция, восстановленная после лиофилизации. Неограничивающие примеры растворителей включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWF1), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы, водные растворы солей и/или буферы.

В другом аспекте изобретения композиция предусмотрена для применения в терапии. Соответственно, в изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция (или лекарственное средство), содержащая композицию, описанную здесь.

В еще одном воплощении в изобретении предложен способ лечения субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, описанной здесь, где субъект имеет заболевание или расстройство, которое можно успешно лечить соединением, нейтрализующим GM-CSF.

Предпочтительно композицию, описанную здесь, применяют в профилактике и/или лечении заболевания, которое можно предупредить, и/или лечить, и/или смягчить с помощью соединений, нейтрализующих GM-CSF.

Термин "субъект" предназначен для включения живых организмов. Примеры субъектов включают млекопитающих, например людей, собак, коров, лошадей, свиней, овец, коз, кошек, мышей, кроликов, крыс и трансгенных животных, не являющихся человеком. В предпочтительных воплощениях изобретения субъект представляет собой человека.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определен как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения нужного эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определен как количество, достаточное для лечения или по меньшей мере частичной остановки заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего от заболевания. Количество, эффективные для этого применения, зависят от тяжести медицинского состояния и общего состояния собственной иммунной системы субъекта. Термин "пациент" включает человека и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Подходящая доза или терапевтически эффективное количество композиции зависит от состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния до терапии, истории болезни пациента и ответа на терапевтический агент. Правильная доза может быть скорректирована в соответствии с решением лечащего врача, так чтобы ее можно было вводить пациенту за один раз или за несколько введений. Фармацевтическую композицию можно вводить как единственное терапевтическое средство или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами в случае необходимости.

Фармацевтические композиции по данному изобретению особенно полезны для парентерального введения, т.е. подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного и/или внутрисиновиального, при этом подкожное введение является предпочтительным. Парентеральное введение может быть осуществлено посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии.

Фармацевтические композиции для инъекции могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта. Кроме того, в последнее время был разработан ряд подходов к доставке лекарственных средств, и фармацевтические композиции по настоящему изобретению пригодны для введения с использованием этих новых методов, например Inject-ease, Genject, инъекторных ручек, таких как Genen, и безыгольных устройств, таких как MediJector и BioJector. Настоящая фармацевтическая композиция также может быть адаптирована для еще не открытых способов введения. См. также Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Лиофилизированные фармацевтические композиции могут предпочтительно быть представлены во флаконе, содержащем активный ингредиент. В одном воплощении фармацевтические композиции дополнительно содержат раствор для восстановления.

Фармацевтическая композиция может, кроме того, содержать дополнительные фармацевтически приемлемые соединения. Другие фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, такие как описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980), могут также быть включены в белковую композицию, описанную в данном документе, при условии, что они не оказывают отрицательного воздействия на необходимые характеристики композиции. Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает любой из и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты, совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают регуляторы тоничности; дополнительные буферные агенты; консерванты; соразтворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры; солеобразующие противоионы, такие как натрий, многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аланин, глицин, аспарагин, 2-фенилаланин и треонин; сахара или сахарные спирты, такие как лактитол, стахиозы, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миоинизитоза, миоинозит, галактоза, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозитол), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, [альфа]-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; и гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон.

Описанные здесь композиции могут быть использованы в качестве фармацевтических композиций

в лечении, и/или предупреждении, и/или устранении заболевания или расстройства у пациента, нуждающегося в этом. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение композиции в организм, отдельную ткань или клетки пациента, который имеет заболевание/расстройство, симптом заболевания/расстройства или предрасположенность к заболеванию/расстройству, с целью вылечить, исцелить, облегчить, ослабить, изменить, устранить, улучшить, оптимизировать или повлиять на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

"Нуждающиеся в лечении" включают пациентов, уже имеющих расстройство, а также тех, у кого расстройство должно быть предотвращено. Термин "расстройство" представляет собой любое состояние, для которого полезно лечение с использованием белковой композиции, описанной в данном документе. Этот термин включает хронические и острые расстройства или заболевания, включающие такие патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к рассматриваемому расстройству. Неограничивающие примеры расстройств, которые предполагается лечить в данном документе, включают воспалительные и аутоиммунные заболевания, предпочтительно включая аллергические и псориатические расстройства, а также артритические и астматические расстройства, например артрит, ревматоидный артрит (RA), аутоиммунный энцефалит, псориаз, рассеянный склероз, легочное заболевание, такое как астма, хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) и острый респираторный дистресс-синдром (ARDS); болезнь Крона, идиопатический легочный фиброз (IPF), воспалительное заболевание кишечника (IBD), увеит, дегенерация желтого пятна, колиты, валлеровское перерождение, антифосфолипидный синдром (APS), острый коронарный синдром, рестеноз, атеросклероз, рецидивирующий полихондрит (RP), острый или хронический гепатит, неудачное приживление ортопедических имплантатов, гломерулонефрит, волчанка, атопический дерматит и воспалительная, артритическая или остеоартритическая боль.

Аллергическим расстройством является любое расстройство, которое вызывается аллергией или аллергической реакцией. Аллергия представляет собой гиперчувствительное расстройство иммунной системы. Она имеет место, когда иммунная система субъекта реагирует или чрезмерно реагирует на обычно безвредные чужеродные вещества (аллергены), такие как продукты питания, пыльца, плесень, домашняя пыль, шерсть животных, пылевые клещи.

Псориаз является аутоиммунным заболеванием, которое влияет, главным образом, на кожу. Цикл роста клеток кожи ускоряется из-за ошибочных сигналов, посылаемых иммунной системой. Существует пять типов псориаза: бляшечный, каплевидный, обратный псориаз, пустулезный псориаз и эритродермический псориаз. Наиболее распространенная форма, бляшечный псориаз, обычно выглядит как чешуйчатые пятна красного и белого оттенков, появляющихся на верхнем первом слое эпидермиса (кожи). Некоторые пациенты, однако, не имеют никаких дерматологических проявлений или симптомов. Расстройство представляет собой хроническое повторяющееся состояние, которое варьируется по степени тяжести от незначительных локализованных очагов до полного покрытия тела. Ногти на руках и ногти на ногах часто подвергаются воздействию (псориатическая дистрофия ногтей), и это может рассматриваться как отдельное проявление. Псориаз может также вызывать воспаление суставов, которое известно как псориатический артрит.

Артрит представляет собой форму расстройства суставов, которая включает воспаление одного или более суставов. Существует более 100 разных форм артрита. Наиболее распространенная форма - остеоартрит (дегенеративное заболевание суставов) является результатом травмы сустава, инфекции сустава или возраста. Другими формами артрита являются ревматоидный артрит, псориатический артрит и другие родственные аутоиммунные заболевания. Септический артрит вызывается инфекцией суставов.

Астма представляет собой распространенное хроническое воспалительное расстройство дыхательных путей, в котором играют роль многие клетки и клеточные элементы. Астма связана с гиперчувствительностью дыхательных путей, которая приводит к повторяющимся эпизодам свистящих хрипов, кашля, стеснения в груди и одышки. Эти эпизоды обычно связаны с распространенной, но изменчивой обструкцией легких, которая часто является обратимой либо спонтанно, либо в результате лечения. Астма может быть классифицирована в зависимости от частоты симптомов, объема форсированного выдоха за одну секунду и пиковой скорости выдоха. Астма также может быть классифицирована как атопическая (экзогенная) или неатопическая (эндогенная).

В дополнение к соединениям, нейтрализующим GM-CSF, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать дополнительные терапевтические или биологически активные агенты. Например, могут присутствовать терапевтические факторы, полезные в лечении конкретного показания, такого как остеоартрит (например, один или более ингибиторов, которые вовлечены в разрушение суставного хряща или синовиальных компонентов, выбранных из, без ограничения ими, антиметаллопротеиназы, циклиновых соединений, антагонистов цитокина, кортикостероидов, ингибиторов TNF (фактор некроза опухоли), IL-ингибиторов, антиангиогенных веществ, ингибиторов агрегканазы, ингибиторов киназы р38, ингибиторов апоптоза, ингибиторов гиалуронидазы и ингибиторов протеолитических ферментов). Факторы, которые контролируют воспаление, включающие инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, нерелимонмаб, лернерцепт и т.п. или их комбинации, также могут быть частью компо-

зиции. Кроме того, предполагается, что фармацевтическая композиция может включать компоненты внеклеточного матрикса, такие как гиалуроновая кислота или ее производное, включая соли, сложный эфир, внутренний сложный эфир и сульфатированные производные, предпочтительно неполный эфир гиалуроновой кислоты.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к набору (или к изделию) или к контейнеру, который содержит композицию по изобретению. Предпочтительно композиция уже может находиться в жидком состоянии. Однако, альтернативно, она может предпочтительно находиться в лиофилизированном состоянии. Она также может находиться в замороженном, лиофилизированном, высушенном замораживанием или высушенном распылением состоянии. Соответственно, если композиция находится в состоянии, не являющемся жидким, она может быть приготовлена практикующим врачом как (жидкая) водная фармацевтическая композиция. Например, композиция может быть лиофилизована и затем должна быть растворена. Соответственно, набор может дополнительно содержать средства для восстановления замороженной, лиофилизованной, высушенной замораживанием или высушенной распылением композиции, и/или средства для разведения композиции, и/или средства для введения композиции или фармацевтической композиции соответственно, такие как шприц, насос, инфузионная помпа, игла или т.п.. Набор может содержать один или более флаконов, содержащих композицию по изобретению. Набор также может сопровождаться инструкциями по применению.

Таким образом, предложено изделие, которое содержит описанную здесь композицию и предпочтительно содержит инструкции по ее применению. Изделие содержит контейнер, подходящий для помещения в него композиции. Подходящие контейнеры включают, без ограничения ими, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (например, однокамерные или двухкамерные шприцы), пробирки, небулайзеры, ингаляторы (например, дозирующие ингаляторы или ингаляторы сухого порошка) или депо. Контейнер может быть выполнен из различных материалов, таких как стекло, металл или пластмасса (например, поликарбонат, полистирол, полипропилен, полиолефин). Контейнер содержит композицию, и этикетка на контейнере или относящаяся к контейнеру может содержать указания по восстановлению и/или применению. На этикетке может быть дополнительно указано, что композиция полезна или предназначена для подкожного введения. Контейнер, содержащий композицию, может представлять собой флакон для многократного использования, который позволяет осуществлять неоднократные введения (например, 2-6 введений) композиции. Изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель (например, WFI, 0,9% NaCl, BWFI, фосфатно-буферный солевой раствор). Когда изделие содержит лиофилизированный вариант композиции соединения, нейтрализующего GM-CSF, смешивание растворителя с лиофилизованной композицией обеспечивает нужную конечную концентрацию белка в восстановленной композиции. Изделие может дополнительно включать другие вещества, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Также в изобретение включены устройства, которые можно использовать для доставки композиции по изобретению. Примеры таких устройств включают, без ограничения ими, шприц, например предварительно заполненный шприц, шприц-ручку, имплантат, безыгольное инъекционное устройство, устройство для ингаляции и пластырь.

Композиции по изобретению являются стабильными в отношении нескольких аспектов, включая межповерхностное напряжение в результате их применения, например, в стеклянном предварительно заполненном шприце и картридже. Было определено, что резиновые составы, силикон, вольфрам и отвердители негативно взаимодействуют с белковыми растворами с образованием агрегатов, невидимых невооруженным глазом и видимых частиц. Белковые композиции по настоящему изобретению совместимы с компонентами предварительно заполненного шприца/картриджной системы, включая их систему укупорки.

Изобретение далее проиллюстрировано посредством графических материалов и примеров, которые являются лишь иллюстративными и не служат для ограничения объема настоящего изобретения.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1: Влияние времени хранения, температуры хранения и концентрации белка на уровень мономеров анти-GM-CSF антитела.

Фиг. 2: Диаграмма Парето стандартизованного эффекта с осмоляльностью [мОсмоль/кг] в качестве переменной.

Фиг. 3: Образование 2-10 мкм частиц в композициях, содержащих 80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 5% сорбита, 30 мМ гистидина и варьирующиеся количества Tween 20.

Фиг. 4: Образование 2-10 мкм частиц в композициях, содержащих 80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 5% сорбита, 30 мМ гистидина и варьирующиеся количества Tween 80.

Фиг. 5: Образование 2-10 мкм частиц в композициях, содержащих 150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 5% сорбита, 30 мМ гистидина и варьирующиеся количества Tween 20.

Фиг. 6: Образование 2-10 мкм частиц в композициях, содержащих 150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 5% сорбита, 30 мМ гистидина и варьирующиеся количества Tween 80.

Фиг. 7: Типичная кривая поверхностного натяжения для анти-GM-CSF антитела и поверхностно-активного вещества.

Фиг. 8: Рост концентрации частиц размером более или равным 10 мкм, в зависимости от числа циклов замораживания/размораживания при концентрации 80 мг/мл анти-GM-CSF антитела в 30 мМ гистидине, с 5% сорбита с варьирующимися концентрациями Tween 20 или Tween 80.

Фиг. 9: Рост концентрации частиц с размером более или равным 10 мкм, в зависимости от числа циклов замораживания/размораживания при концентрации 150 мг/мл анти-GM-CSF антитела в 30 мМ гистидине, с 5% сорбита с варьирующимися концентрациями Tween 20 или Tween 80.

Следующие аспекты также характеризуют настоящее изобретение:

1. Композиция, содержащая соединение, нейтрализующее GM-CSF, в концентрации по меньшей мере примерно 20 мг/мл, регулятор тоничности, буфер и одно или более из поверхностно-активных веществ, аминокислот, антиоксидантов и/или хелатирующих агентов, где композиция является стабильной.

2. Композиция согласно аспекту 1, содержащая соединение, нейтрализующее GM-CSF, регулятор тоничности, буфер и поверхностно-активное вещество.

3. Композиция согласно аспекту 1 или 2, где соединение, нейтрализующее GM-CSF, присутствует в концентрации по меньшей мере примерно 50 мг/мл, регулятор тоничности присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 15% (мас./об.), и буфер присутствует в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ.

4. Композиция по любому из аспектов 1-3, где регулятор тоничности выбран из маннита, сорбита, сахарозы и/или трегалозы.

5. Композиция по любому из аспектов 1-4, где буфер выбран из гистидинового, ацетатного и/или цитратного буфера.

6. Композиция по любому из аспектов 1-5, где поверхностно-активное вещество выбрано из одного или более из полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамеров и их комбинаций.

7. Композиция по любому из аспектов 1-6, где соединение, нейтрализующее GM-CSF, присутствует в концентрации по меньшей мере примерно 50 мг/мл и менее чем примерно 200 мг/мл, регулятор тоничности присутствует в концентрации от примерно 3 до примерно 7% (мас./об.), буфер присутствует в концентрации от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ, и поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от примерно 0,001% до примерно 1% (мас./об.).

8. Композиция по любому из аспектов 1-7, где pH составляет от примерно 5 до примерно 7.

9. Композиция по любому из аспектов 1-8, где регулятор тоничности представляет собой сорбит и буфер представляет собой гистидиновый буфер.

10. Композиция по любому из аспектов 2-9, которая дополнительно содержит антиоксидант.

11. Композиция по любому из аспектов 1-10, где соединение, нейтрализующее GM-CSF, выбран из группы, состоящей из полипептида, пептидомиметика, нуклеиновой кислоты и малой молекулы.

12. Композиция по аспекту 11, где полипептид представляет собой антитело или его функциональный фрагмент, связывающийся с GM-CSF или с рецептором GM-CSF.

13. Композиция по аспекту 12, где антитело или его функциональный фрагмент представляют собой человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент.

14. Композиция по аспекту 12 или 13, где антитело представляет собой антитело IgG, IgG1 или IgG4.

15. Композиция по любому из аспектов 12-14, где антитело или его функциональный фрагмент связываются с эпитопом GM-CSF, предпочтительно содержащим аминокислоты 23-27 (RRLLN) и/или аминокислоты 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL).

16. Композиция по аспекту 15, где указанный эпитоп дополнительно содержит:

(1) аминокислоты 28-31 (LSRD);

(2) аминокислоты 32-33 (TA) и/или

(3) аминокислоты 21-22 (EA).

17. Композиция по аспекту 15 или 16, где указанный эпитоп представляет собой прерывистый эпитоп.

18. Композиция по любому из аспектов 12-17, где указанное антитело или его функциональный фрагмент содержат в своей вариабельной области тяжелой цепи участок CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 1-13 и 56.

19. Композиция по аспекту 18, где любая из указанных последовательностей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи присутствует в вариабельной области тяжелой цепи вместе с участком CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и участком CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

20. Композиция по любому из аспектов 12-19, где указанное антитело или его функциональный фрагмент содержат в вариабельной области своей легкой цепи CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность,

тельность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

21. Композиция по любому из аспектов 12-20, где указанное антителило или его функциональный фрагмент содержат в вариабельной области своей легкой цепи аминокислотную последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 19, 54 и 55.

22. Композиция по любому из аспектов 12-21, где указанное антителило или его функциональный фрагмент содержат в своей вариабельной области тяжелой цепи аминокислотную последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 20-33, 52 и 53.

23. Композиция по любому из аспектов 12-22, где указанное антителило или его функциональный фрагмент содержат в вариабельной области своей легкой цепи CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; и в вариабельной области своей тяжелой цепи содержит CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, CDR2 содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-13 и 56.

24. Композиция по любому из аспектов 12-23, где указанное антителило или его функциональный фрагмент содержат в вариабельной области своей легкой цепи CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; и в вариабельной области своей тяжелой цепи содержит CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

25. Композиция по любому из аспектов 12-24, где указанное антителило или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 34, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 35-48.

26. Композиция по любому из аспектов 12-25, где указанное антителило или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 34, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 35.

27. Композиция по любому из аспектов 12-26, где указанное антителило или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% гомологию с соответствующей аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-48 и 52-56, предпочтительно с соответствующей аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-18 и 56, и/или с аминокислотной последовательностью каркасных участков внутри аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 19-48 и 52-55.

28. Композиция по любому из аспектов 1-27, которая содержит:

1) от примерно 50 мг/мл до примерно 180 мг/мл соединения, нейтрализующего GM-CSF;

2) примерно 5% (мас./об.) сорбита;

3) примерно 30 мМ L-гистидина;

4) от примерно 0,001 до примерно 1% (мас./об.) поверхностно-активного вещества и

5) имеет pH примерно 5,8.

29. Композиция по аспекту 28, которая содержит примерно 80 или примерно 150 мг/мл соединения, нейтрализующего GM-CSF

30. Композиция по любому из аспектов 1-29, которая представляет собой жидкую, предпочтительно водную композицию.

31. Композиция по любому из аспектов 1-30, которая является стабильной в течение по меньшей мере 24 месяцев при примерно 2-8°C или по меньшей мере 28 суток при комнатной температуре.

32. Композиция по любому из аспектов 1-31 для применения в терапии.

33. Композиция по любому из аспектов 1-32, которая предназначена для внутривенного и/или подкожного введения.

34. Композиция по любому из аспектов 1-33 для применения в лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний, предпочтительно включающих аллергические и псориатические расстройства, а также артритические и астматические расстройства.

35. Набор, содержащий композицию по любому из аспектов 1-34.

36. Набор по аспекту 35, содержащий предварительно заполненный шприц, картридж или автоинжектор.

Следует понимать, что изобретения, описанные здесь, не ограничены конкретной методологией, протоколами или реагентами и как таковое может варьироваться. Обсуждение и примеры, предложенные здесь, представлены только с целью описания конкретных воплощений и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, которое определяется исключительно формулой изобретения.



Следующие ниже примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

Пример 1. Вещество.

Следующие примеры выполняли с человеческим моноклональным антителом IgG1 (в дальнейшем называемым "антитело"), которое связывается с человеческим GM-CSF и нейтрализуют его с высокой аффинностью и специфичностью и которое описано в WO 2006/111353. Его получение описано в Примере 2 в WO 2006/111353. Более конкретно, антитело содержит последовательности CDR легкой и тяжелой цепей, как описано в SEQ ID NO: 16-18, 14, 15 и 2. Эти последовательности CDR содержатся в вариабельном домене тяжелой и легкой цепей соответственно, показанных в SEQ ID NO: 34 и 35. GM-CSF аберрантно гиперпродуцируется при множестве провоспалительных и аутоиммунных заболеваний человека, и было обнаружено, что добавление рекомбинантного GM-CSF усиливает такие заболевания. Возможные болезненные показания для лечения GM-CSF-нейтрализующим антителом включают ревматоидный артрит (RA), астму и другие формы воспаления легких, рассеянный склероз (MS) и псориаз.

Антитела получали в биореакторе с использованием среды, не содержащей сыворотки и белков. Инокулят для производственного ферментера готовили из одного флакона антитело-продуцирующего клона. После завершения процесса ферментации собранную культуру, содержащую секретируемые антитела, подвергали фильтрации для отделения клеток и дроба от надосадочной жидкости. Очистка собранной культуры основана на общих хроматографических подходах уменьшения HCP (белки клетки-хозяина), ДНК и возможных вирусов. Стадия инактивации интегрального вируса была дополнительной частью последующего процесса обработки. Для композиции выполняли стадию концентрирования и замены буфера.

Пример 2. Методы анализов.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC) была использована для определения степени агрегации антитела (HPLC: Agilent 1100 Chemstation; колонка: Tosoh Biosep TSKgel G4000SWXL). Метод SE-HPLC проверяли на соответствие требованиям путем выполнения девятиточечного анализа диапазона, в котором были определены и проанализированы точность (шесть повторных инъекций) и линейность (стандартные кривые в трех повторностях). Все анализы выполняли с использованием 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 6,6 в качестве подвижного буфера.

Метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR) был использован для определения степени активности связывания антител с иммобилизованным GM-CSF (Biacore 3000/CM5 сенсорный чип/HBS-EP подвижный буфер). Метод SPR проверяли на соответствие требованиям путем выполнения девятиточечного анализа диапазона, в котором были определены и проанализированы точность (шесть повторных инъекций) и линейность (стандартные кривые в трех повторностях).

SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях выполняли для определения продуктов деградации (фрагменты) и агрегатов антитела.

Визуализацию микропотока (MFI, Brightwell, Ottawa, CA) выполняли с целью определения количества собственных и примесных невидимых невооруженным глазом частиц в растворе для частиц размером от примерно 2 до 100 мкм.

Катионообменную хроматографию (CEX) выполняли для оценки имеющих заряд изоформ с использованием колонки WCX-10 и градиента pH в подвижном буфере TRIS/имидазол/пиперазин. Кислотные изоформы элюировались раньше главной изоформы, и основные изоформы элюировались после главной изоформы.

Силу трения шприца определяли с использованием универсальной компрессионной аналитической системы Instron®, оснащенной адаптерами для фиксации шприцев.

Пример 3. Влияние pH и температурного напряжения.

Исследование проводили для оценки стабильности антитела в буфере для скрининга с низкой ионной силой (LISSB: 2 mM глицина, 2 mM лимонной кислоты, 2 mM HEPES, 2 mM MES и 2 mM Tris) при значениях pH в диапазоне от 3 до 10. Образцы антител хранили в соответствующих растворах при 55°C в течение 14 суток. Образцы анализировали в T0, T7 и T14 (сутки). Анализ посредством SPR показал, что антитело является наиболее стабильным при pH 4-7. При анализе посредством SE-HPLC было обнаружено, что мономер антитела был наиболее стабильным при pH 4-6 (T14). Анализы посредством SDS-PAGE образцов T14 как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях показали только минимальное образование продуктов деградации и агрегатов при pH 4-6.

Пример 4. Влияние стресса, индуцированного ионной силой и температурой.

Исследование проводили для оценки стабильности антитела в буфере для скрининга с низкой ионной силой (LISSB) в присутствии 0, 10, 100 и 500 mM NaCl. Образцы антител подвергали диализу в растворах LISSB (pH 4,5 и 7,5) с добавлением NaCl до концентрации примерно 1 мг/мл и хранили при 55°C в течение 14-дневного периода. На 0, 7 и 14 сутки (T0, T7 и T14) образцы анализировали посредством SE-HPLC и SPR.

Исследования посредством HPLC и SPR показали, что добавление соли ухудшает стабильность антител и что этот эффект больше выражен при pH 4,5, чем при pH 7,5. Кроме того, данные SE-HPLC показали, что дестабилизация антитела с повышением концентрации соли ( $\geq 100$  mM) при pH 4,5 приводит,

главным образом, к накоплению агрегатов антитела. При pH 7,5 дестабилизация антитела повышенными концентрациями соли (500 мМ) приводит, главным образом, к накоплению продуктов деградации антитела. В LISSB pH 4,5; 500 мМ NaCl, уровень преципитации (T7 и T14) антитела был очень высоким.

Пример 5. Влияние буферов.

Исследование проводили для оценки стабильности антитела в различных буферах, имеющих pH 5-7. Образцы антител подвергали диализу в растворах 20 мМ цитратного буфера, pH 5, 6 и 7; 20 мМ фосфатного буфера, pH 6 и 7; 20 мМ сукцинатного буфера, pH 6 и 7, 20 мМ гистидинового буфера, pH 6 и 7 и 20 мМ ацетатного буфера, pH 5 и 6, до концентрации примерно 1 мг/мл и хранили при 55°C в течение 14 суток. В T0, T7 и T14 (сутки) образцы анализировали посредством SE-HPLC, SPR и SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Данные SPR исследования, данные HPLC по мономерам и агрегатам и данные SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях указывают на то, что антитело является наиболее стабильными в ацетатном буфере pH 5, гистидиновом буфере pH 6 и цитратном буфере pH 5, 6 и 7 (данные для T14).

Пример 6. Влияние аминокислот.

Исследование проводили для оценки стабильности антитела в буфере для скрининга с низкой ионной силой (LISSB) с добавлением разных аминокислот. Образцы антитела хранили в растворе при pH 6 с 250 мМ соответствующей аминокислоты при 55°C в течение 14 суток. В T0, T7 и T14 образцы анализировали. Исследование SPR указывает на небольшой стабилизирующий эффект, особенно глутаминовой кислоты, треонина, лизина и валина (T14). Данные HPLC указывают на стабилизирующий и значительный эффект глутаминовой кислоты, треонина и аланина, приводящий к увеличению интактных мономеров примерно на 2-3% и уменьшению агрегатов примерно на 30, 31 и 20% соответственно по сравнению с контролем без добавления аминокислот.

Пример 7. Влияние сахаров и поверхностно-активных веществ.

Исследование проводили для оценки стабильности антитела в буфере для скрининга с низкой ионной силой (LISSB) с добавлением различных сахаров или поверхностно-активных веществ. Образцы антител подвергали диализу в растворах LISSB, pH 6,0, до концентрации примерно 1 мг/мл с добавлением 6% (мас./об.) сахаров (D-маннит, D-сорбит, сахароза, D-манноза, D-мальтоза, D-трегалоза, D-глюкоза), 0,05% (об./об.) Tween 20 или 0,02% (об./об.) Tween 80 и хранили при 55°C в течение 14 суток. В T0, T7 и T14 (сутки) образцы анализировали посредством SE-HPLC, SPR и SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Исследования SPR и HPLC указывают на то, что D-сорбит и D-маннит улучшают стабильность антитела примерно на 20%/3% (данные SPR/HPLC, T14) и 14%/4% (данные SPR/HPLC, T14) соответственно. И трегалоза, и сахароза обладали пониженным эффектом - на 7%/0,7% (данные SPR/HPLC на 14 сутки) и 6%/2% (данные SPR/HPLC на 14 сутки) соответственно. Кроме того, данные HPLC указывают на то, что D-сорбит и D-маннит уменьшают образование агрегатов антител на 43 и 50% соответственно, что также подтверждается данными, полученными посредством SDS-PAGE. По всей видимости, ни 0,05% (об./об.) Tween 20, ни 0,02% (об./об.) Tween 80 не влияют на стабильность, измеренную посредством эксклюзионной HPLC, SPR и SDS-PAGE.

Пример 8. Влияние комбинаций буферов, аминокислот и сахаров.

На основании предыдущих исследований было проведено исследование для оценки стабильности 1 мг/мл антитела, приготовленного в комбинациях буферов, аминокислот и сахаров. Предыдущие исследования показали стабилизирующие эффекты: 20 мМ ацетата pH 5; 20 мМ гистидина pH 6; 250 мМ глутаминовой кислоты; 250 мМ треонина, 6% (мас./об.) сорбита и 6% (мас./об.) маннита. Антитело готовили в концентрации 5,4 мг/мл в растворах из комбинаций 20 мМ буфера, 250 мМ аминокислоты и 6% (об./об.) сахара, как показано в табл. 1, и хранили при 55°C в течение периода 14 суток. Антитела в 1xPBS включали в качестве контроля. В T0, T7 и T14 (сутки) образцы анализировали посредством SE-HPLC и SPR.

Кроме того, образцы T0, содержащие антитело (5,4 мг/мл) в 1xPBS, тестировали на чувствительность к замораживанию и размораживанию. Флаконы для хранения медленно замораживали при -20°C в морозильной камере. После окончания замораживания образцы размораживали при комнатной температуре. Этот процесс повторяли до окончания пяти циклов замораживания-размораживания. Каждый образец исследовали на восстановление посредством SPR и SE-HPLC после двух и пяти циклов.

Таблица 1

Комбинация буферов, сахаров и аминокислот  
(Ac = ацетатный буфер; His = гистидиновый буфер;  
M = маннит; S = сорбит)

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Буфер	Ac	x	x		x	x			x	x	x	x					
	His			x	x			x	x					x	x	x	x
Аминокислота	Glu	x		x					x	x				x	x		
	Thr		x		x						x	x				x	x
Сахар	M					x		x			x			x		x	
	S							x		x			x			x	

Данные SPR показали, что активности связывания в образцах 5-16 в T14/55°C составляют более 93% по сравнению с T0. Для антитела в 1×PBS (образец 17) и образцов 1-4 (все без маннита или сорбита) эти значения составляют 62, 19, 26, 91 и 85% соответственно. Данные SPR, следовательно, указывают, что добавление маннита или сорбита улучшает стабильность связывающей активности. Кроме того, образцы 1-4 становились желтоватыми в T7 и T14, что указывало на окисление. Данные SE-HPLC показали, что самый низкий уровень агрегатов (3,5-5,6%) и продуктов деградации (4,2% - 5,4%) обнаруживаются в образцах 5-8, 11-12 и 15-16 (данные для T14/55°C), подтверждая стабилизирующий эффект маннита и сорбита на мономерную форму антитела и указывая на возможный незначительный эффект от добавления 250 мМ треонина. Эффект треонина, однако, является по меньшей мере только минимальным, если судить по уровню мономеров, обнаруженных в образцах 5-8, 11-12 и 15-16 (91,2, 89,8, 91,5, 90,8, 89,8, 89,0, 91,4 и 90,9% соответственно) - для образца 17 (PBS) это значение составляет 80,3% (данные для T14/55°C). 250 мМ глутаминовая кислота вместе с сорбитом или маннитом оказывает негативное влияние на стабильность мономерной формы антитела, особенно в ацетатном буфере. В заключение, мономер антитела, по-видимому, является наиболее стабильным в комбинации 20 мМ ацетатного буфера pH 5 или 20 мМ гистидинового буфера pH 6 и 6% (мас./об.) сорбита или 6% (мас./об.) маннита.

Данные SE-HPLC из экспериментов замораживания/размораживания указывают на немного большее влияние сорбита по сравнению с маннитом в стабилизации мономера антитела. В образцах 6 и 8 содержание мономера составляет 98,6 и 98,4% соответственно после 5 циклов замораживания/размораживания по сравнению с содержанием мономеров в образцах 5 и 7, составляющим 96,9 и 96,0%.

Пример 9. Влияние комбинаций гистидинового или ацетатного буферов, сорбита или маннита и Tween 20 или Tween 80.

На основе данных по стабильности из предыдущих исследований (показывающих стабилизирующий эффект в частности 20 мМ ацетата pH 5, 20 мМ гистидина pH 6, 6% (мас./об.) сорбита и 6% (мас./об.) маннита) выполняли новое исследование для оценки стабильности 10 мг/мл антитела, приготовленного в комбинациях с гистидиновым или ацетатным буфером, сорбитом или маннитом, и Tween 20 или Tween 80. При концентрациях антитела 10 мг/мл также анализировали влияние добавления 0,02% (мас./об.) Tween 20 и 0,02% (мас./об.) Tween 80 на агрегацию, измеренную посредством SE-HPLC.

Антитело было приготовлено в концентрации 10 мг/мл в растворах 20 мМ ацетатного буфера pH 5,0 или 20 мМ гистидинового буфера pH 6,0 и с активностями, указанными в табл. 2, и его хранили при 55°C в течение 14 суток. Образцы в T0, T7 и T14 (сутки) анализировали посредством эксклюзионной HPLC и SPR.

Кроме того, образцы антитела тестировали на чувствительность к замораживанию и размораживанию. Антитело медленно замораживали в концентрации 10 мг/мл при -20°C в морозильной камере. После завершения замораживания образцы размораживали при комнатной температуре. Этот процесс повторяли до окончания трех и/или пяти циклов замораживания и размораживания. В каждом образце после трех и/или пяти циклов замораживания и размораживания исследовали восстановление посредством SPR и SE-HPLC.

Таблица 2

Комбинация буферов, сахаров и детергентов  
(Ac = ацетатный буфер; His = гистидиновый буфер;  
M = маннит; S = сорбит; T20 = Tween 20;  
T80 = Tween 80)

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Буфер	Ac	x	x			x	x	x	x			
	His			x	x					x	x	x
Сахар	M		x		x			x	x			x
	S	x		x		x	x			x	x	
Детергент	T20					x		x		x		x
	T80						x		x		x	

Данные HPLC показали, что, несмотря на незначительную разницу между ацетатом и гистидином, гистидин представляется по меньшей мере таким же хорошим, как ацетат. Через 1 неделю композиции, содержащие ацетат, сорбит и tween 80 и гистидин, сорбит и tween 20 имели аналогичную деградацию по сравнению с соответствующими композициями без поверхностно-активного вещества.

Эксперименты по замораживанию и размораживанию показывают, что после пяти циклов замораживания и размораживания по меньшей мере нет никакого влияния детергентов на уровень мономера антитела. Однако мономер антитела является более стабильным при добавлении 6% (мас./об.) сорбита к композиции по сравнению с 6% (мас./об.) маннита. При добавлении маннита мономер антитела агрегирует в большей степени после пяти циклов замораживания и размораживания. Данные HPLC из эксперимента по замораживанию и размораживанию не выявили разницы между использованием ацетата и гистидина.

В заключение необходимо отметить, что предварительная композиция, содержащая 20 мМ гистидина, 6% (мас./об.) сорбита и имеющая pH 6,0, представляется оптимальной для стабильности мономера антитела при анализе посредством HPLC.

Пример 10. Оценка кратковременной стабильности предварительной композиции, содержащей 20 мМ гистидина, 6% (мас./об.) D-сорбита.

На основании идентификации 20 мМ гистидина pH 6,0 и 6% (мас./об.) сорбита в качестве оптимальной предварительной композиции было выполнено тестирование кратковременной стабильности для оценки этой предварительной композиции при более высоких концентрациях антитела.

Антитело готовили в вышеуказанном растворе в концентрациях примерно 22, 36, 42, 83 и 118 мг/мл. Приготовленные в виде композиции антитела хранили при 5 и 25°C в течение периода вплоть до 4 недель. Образцы T0, T14 и T28 (сутки) анализировали посредством SE-HPLC.

Данные SE-HPLC ясно показывают, что антитело является стабильным в композиции 20 мМ гистидина pH 6,0, 6% (мас./об.) сорбита. Концентрация мономера антитела, определенная после 28 суток хранения при 5 или 25°C, была всегда выше 97%, за исключением самой высокой тестируемой концентрации антитела (118 мг/мл) при 25°C, где концентрация мономера антитела составляла примерно 96,5%. Результаты показаны на фиг. 1.

Пример 11. Точная корректировка конечных эксципиентов.

На основании данных, полученных в предыдущих экспериментах, для стабилизации антитела были выбраны сорбит и гистидин. На следующей стадии количество эксципиентов, а также значение pH были точно скорректированы для концентраций антитела от 10 до 100 мг/мл с использованием "Плана эксперимента" (DOE), включающего три центральные точки и приводящего к 30 отдельным прогонам. Рандомизированный экспериментальный план выполняли со следующими параметрами:

антитела: 10-55-100 мг/мл, pH: 5-6-7;

гистидин: 10-30-50 мМ;

сорбит: 2-6-10% (мас./об.).

Чтобы обеспечить возможность кратковременной оценки, образцы подвергали воздействию условий ускоренного исследования при 50°C в течение 14 суток. Кроме того, были выполнены три цикла замораживания-размораживания (-20°C), чтобы имитировать условия хранения антитела.

Результаты.

Осмоляльность определяли для обеспечения физиологических условий для композиции. Для внутривенного или подкожного применения антитела приемлемым диапазоном является осмоляльность от 250 до 450 мОсмоль/кг. Как показано на фиг. 2, осмоляльность главным образом контролируется количеством сорбита в композиции. И гистидин в низких концентрациях (10-50 мМ), и само антитело оказывают только минимальное влияние на осмоляльность.

Зависимость осмоляльности от концентрации сорбита и гистидина может быть изображена в виде

контурного графика. Этот график показывает, что, для того чтобы поддерживать осмоляльность в физиологическом интервале, необходима концентрация от 3 до 7% (мас./об.) сорбита. Полученные данные указывают на оптимальную концентрацию сорбита примерно 6%, что приводит к достаточно высокой величине осмоляльности. Так как некоторое уменьшение сорбита не влияет на стабильность антитела, концентрация сорбита может быть уменьшена до 5%, чтобы достичь величины осмоляльности примерно 400 мОсмоль/кг и, следовательно, повысить удобство для пациента.

На основании полученных данных оптимальную концентрацию гистидина принимали равной 30 мМ. В диапазоне концентрации от 10 до 50 мМ гистидина не было обнаружено влияния на агрегацию или фрагментацию при измерении посредством SE-HPLC.

Агрегация антител, главным образом, зависит от концентрации. Повышенная концентрация антител приводит к более высокому уровню агрегации и к повышенным значениям прозрачности при замораживании/размораживании и в условиях ускоренного температурного стресса. Кроме того, значение pH влияет на мономерный состав антитела. В то время как ускоренный стресс при pH менее 6 приводит к повышенной фрагментации антитела, на стабильность во время замораживания/размораживания влияния не оказывается, скорее наблюдается несколько лучшая стабильность. При значениях pH более 6, для обоих воздействий-температуры при ускоренном исследовании и замораживания/размораживания, пониженное содержание мономера может быть измерено с использованием SE-HPLC и анализа прозрачности. Для того, чтобы сбалансировать противоположные эффекты, pH 5,8 представляется наиболее подходящим для композиции антитела.

Это привело к композиции со следующими параметрами:

Антитело	10 мг/мл – 55 мг/мл – 100 мг/мл
D-сорбит	5% (масс./об.)
L-гистидиновый буфер	30 мМ (гидрохлорид моногидрат)
pH	5,8 (корректировали 2М гидроксидом натрия)

Условия или параметры для этой композиции также могут быть перенесены на композиции с более высокими концентрациями антител, как это будет показано в следующих ниже примерах

Пример 12. Исследования стабильности.

Долговременные исследования.

Исследование было спланировано на период испытаний вплоть до 60 месяцев. Во время этого периода образцы антител хранили при  $5\pm 3^\circ\text{C}$  в стеклянных сосудах DIN R2. Кроме того, выполняли ускоренное исследование при  $25\pm 2^\circ\text{C}$  и стрессовое исследование при  $40\pm 2^\circ\text{C}$  в стеклянных сосудах DIN R2 в течение вплоть до 12 и 6 месяцев соответственно. Тестирование выполняли с использованием антитела в концентрации 106 и 145 мг/мл, в композиции с 30 мМ гистидина моногидрохлорида и 5% (мас./об.) сорбита при pH 5,8.

Измеряли следующие параметры: pH, осмоляльность, концентрация (OD280), процент мономеров, агрегатов и фрагментов посредством SE-HPLC, активность (клеточный анализ). Результаты представлены в следующих табл. 3-8.

Таблица 3

Тестирование стабильности при  $5\pm 3^\circ\text{C}$  (106 мг/мл антитела)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Момеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) SE-HPLC			Активность (Клеточный анализ)
				M / A / F [%]			
[Месяцы]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,88	379	103,00	99,18	0,82	0	1,03
3	5,90	379	108,75	99,07	0,93	0	1,23
6	5,89	376	100,05	98,87	1,13	0	0,89
9	5,83	377	102,59	99,01	0,99	0	1,00
12	5,86	387	103,34	98,97	1,03	0	1,01
18	5,87	379	102,49	98,78	1,04	0,18	0,84
24	5,85	377	101,73	98,68	1,11	0,21	1,05
30	5,81	383	102,52	98,55	1,17	0,28	0,83
36	5,84	380	107,78	98,56	1,18	0,25	1,06
42	5,92	384	96,32	98,34	1,11	0,55	1,26
48	5,90	376	94,33	98,54	1,23	0,23	1,03
54	5,86	382	107,67	98,25	1,28	0,47	1,04
60	5,90	379	106,79	98,26	1,26	0,48	0,97

Таблица 4

Тестирование стабильности при  $5\pm 3^\circ\text{C}$  (145 мг/мл антитела)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
				M / A / F [%]			
[Месяцы]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,91	393	139,52	99,06	0,94	0	0,95
3	5,93	385	139,44	98,89	1,11	0	1,06
6	5,90	381	145,66	98,79	1,21	0	0,81
9	5,87	383	144,12	98,86	1,14	0	1,07
12	5,89	388	140,52	98,80	1,20	0	1,13
18	5,90	387	143,66	98,62	1,22	0,16	1,09
24	5,85	385	137,07	98,45	1,38	0,17	0,83
30	5,84	387	131,98	98,30	1,42	0,28	0,87
36	5,88	384	148,55	98,35	1,39	0,26	0,99
42	5,94	383	134,11	98,17	1,33	0,50	0,97
48	5,94	385	125,09	98,23	1,50	0,26	1,03
54	5,90	394	150,81	97,94	1,57	0,49	1,04
60	5,90	386	147,01	97,94	1,53	0,53	0,82

Таблица 5

Тестирование стабильности при  $25\pm 2^\circ\text{C}$  (106 мг/мл антитела)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
				M / A / F [%]			
[Месяцы]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,84	385	101,35	98,77	1,06	0,17	1,20
3	5,90	382	107,36	98,15	1,44	0,42	0,92
6	5,85	387	100,14	97,85	1,51	0,64	1,00
9	5,83	374	107,49	94,71	1,49	3,80	1,10
12	5,85	383	106,27	94,71	1,56	3,73	1,30

Таблица 6

Тестирование стабильности при  $25\pm 2^\circ\text{C}$  (145 мг/мл антител)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
				M / A / F [%]			
[Месяцы]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,90	384	142,84	98,49	1,19	0,31	0,95
3	5,93	386	147,84	98,12	1,50	0,37	1,04
6	5,88	383	134,73	97,62	1,78	0,60	0,78
9	5,91	387	144,59	94,46	1,85	3,69	0,97
12	5,87	387	143,12	94,36	1,90	3,74	1,23

Таблица 7

## Тестирование стабильности при 40±2°C (106 мг/мл антитела)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Эффективность (Анализ на основе клеток)
[Месяц]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная эффективность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,88	377	102,68	94,66	1,34	3,99	1,05
3	5,89	382	108,60	91,85	2,06	6,09	1,01
6	5,85	378	99,75	87,39	2,46	10,15	0,97

Таблица 8

## Тестирование стабильности при 40±2°C (145 мг/мл антител)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
[Месяц]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,92	388	136,96	94,96	1,69	3,35	0,77
3	5,91	386	143,07	92,02	2,40	5,58	0,87
6	5,88	388	137,11	86,56	3,33	10,11	0,94

Ускоренные/стрессовые исследования.

Чтобы продемонстрировать сопоставимость лекарственного вещества, следовательно, антитела, после масштабирования, исследование стабильности выполняли в ускоренных (25°C) и стрессовых условиях (40°C), используя две партии лекарственного вещества с концентрациями антител 165 и 171 мг/мл, приготовленные в растворе 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8.

Измеряли следующие параметры: pH, осмоляльность, концентрация (OD280), процент мономеров, агрегатов и фрагментов, определенный посредством SE-HPLC, активность (клеточный анализ). Результаты для концентрации антитела 171 мг/мл показаны в следующих ниже табл. 9 и 10.

Таблица 9

## Тестирование стабильности при 25±2°C (171 мг/мл антитела)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
[Месяцы]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,7	--	169,00	более 99,0	0,6	менее 1%	0,97
2	5,6	--	171,00	98,3	1,7	менее 1%	0,92
3	5,7	--	173,00	98,0	2,0	менее 1%	1,14

Таблица 10

## Тестирование стабильности при 40±2°C (171 мг/мл антитела)

Время хранения	pH	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (M) Агрегаты (A) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
[Месяц]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]	M / A / F [%]			Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0	5,7	--	169,0	более 99,0	0,6	менее 1%	0,97
2	5,6	--	171,0	92,5	2,9	менее 5%	0,90
3	5,7	--	175,0	90,3	3,5	менее 7%	0,91

Исследования замораживания/размораживания.

Стабильность при замораживании/размораживании анализировали для концентраций антитела 106 и 145 мг/мл, приготовленных в растворе 30 мМ гистидина, рН 5,8 и 5% сорбита. Антитело замораживали при  $-80\pm 10^\circ\text{C}$  по меньшей мере в течение ночи. Размораживание выполняли в течение  $\geq 6$  ч при комнатной температуре. Выполняли 0, 1, 3, 5, 7 и 10 циклов замораживания/размораживания.

Измеряли следующие параметры: рН, осмоляльность, концентрация (OD280), процент мономеров, агрегатов и фрагментов посредством SE-HPLC, активность (клеточный анализ). Результаты показаны в следующих табл. 11 и 12.

Таблица 11

Тестирование стабильности при замораживании/размораживании при  $-80\pm 10^\circ\text{C}$  (106 мг/мл антитела)

Число циклов з/о	рН	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (М) Агрегаты (А) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
				М / А / F [%]			
[No.]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]				Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0x	5,86	373	99,07	99,05	0,95	0	0,84
1x	5,86	381	99,37	99,19	0,81	0	1,05
3x	5,89	379	98,23	99,20	0,80	0	1,11
5x	5,87	380	99,69	99,15	0,85	0	1,15
7x	5,86	380	99,96	99,12	0,88	0	1,24
10x	5,87	378	98,94	99,08	0,92	0	0,83

Таблица 12

Тестирование стабильности при замораживании/размораживании при  $-80\pm 10^\circ\text{C}$  (145 мг/мл антитела)

Число циклов з/о	рН	Осмоляльность	Концентрация (OD280)	Мономеры (М) Агрегаты (А) Фрагменты (F) эксклюзионная HPLC			Активность (Клеточный анализ)
				М / А / F [%]			
[No.]	-	[мОсмоль/кг]	[мг/мл]				Относительная активность (по сравнению со стандартным образцом)
0x	5,86	373	133,13	98,94	1,06	0	0,81
1x	5,90	379	132,98	99,11	0,89	0	1,16
3x	5,89	380	134,56	99,09	0,91	0	1,04
5x	5,90	384	132,74	99,07	0,93	0	1,11
7x	5,90	383	134,54	99,03	0,97	0	1,04
10x	5,91	385	132,89	98,96	1,04	0	1,05

Результаты и заключение.

Исследование долговременной стабильности, включающее ускоренные и стрессовые условия, выполняли вплоть до 60 месяцев для концентраций антител примерно 106 и примерно 145 мг/мл в композициях, содержащих 30 мМ гистидина, 5% сорбита, рН 5,8. Дополнительные исследования стабильности в ускоренных и стрессовых условиях также выполняли для концентрации антител вплоть до примерно 171 мг/мл в 30 мМ гистидина, 5% сорбита, рН 5,8.

В течение периода 60 месяцев образцы, хранившиеся при  $5\pm 3^\circ\text{C}$ , при обеих концентрациях, показали менее 2% агрегации и имели такую же активность, что и стандартный образец.

Через 12 месяцев хранения в ускоренных условиях ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) обе концентрации (106 и 145 мг/мл) показали менее 2% агрегации и имели такую же активность, что и стандартный образец. Через 6 месяцев хранения при стрессовых условиях ( $40\pm 2^\circ\text{C}$ ) обе концентрации показали менее 5% агрегации и имели примерно такую же активность, что и стандартный образец.

Данные дополнительных ускоренных/стрессовых исследований показали стабильность в течение 3 месяцев и 1 месяца при 25 и  $40^\circ\text{C}$  соответственно. Это указывает на то, что стабильность при  $2-8^\circ\text{C}$ , как можно ожидать, будет сравнима со стабильностью, полученной для концентраций антитела 106 и 145 мг/мл, как обсуждается выше.

Кроме того, антитело в 30 мМ гистидина, 5% сорбита, рН 5,8 является стабильным в течение по меньшей мере 10 циклов замораживания/размораживания при  $-80\pm 10^\circ\text{C}$  для обеих тестируемых концентраций антител, составляющих примерно 106 и примерно 145 мг/мл.

Пример 13. Оценка вязкости.

Вязкость определяли для концентрации антитела 150 мг/мл, приготовленного в растворе 30 мМ гистидина рН 5,8 и 5% сорбита, с помощью реометра. Реометр используют для таких жидкостей, которые



не могут быть охарактеризованы одним значением вязкости и, следовательно, требуют установления и измерения большего количества параметров, чем при использовании вискозиметра.

Для некоторых жидкостей вязкость является постоянной в широком диапазоне скоростей сдвига (ньютоновские жидкости). Жидкости без постоянной вязкости (неньютоновские жидкости) не могут быть описаны одним числом. Неньютоновские жидкости обнаруживают различные зависимости между напряжением сдвига и скоростью сдвига. Следовательно, вязкость зависит от температуры, а также от скорости сдвига для неньютоновских жидкостей. Вязкость указывается в миллипаскаль-секундах (мПа·с) при данной температуре и данной скорости сдвига [1/с].

Вязкость композиции, содержащей примерно 150 мг/мл антитела, ниже 12 мПа·с при скорости сдвига от примерно 50 до примерно 1000 [1/с] при температуре 20°C.

Вязкость композиции, содержащей примерно 150 мг/мл антитела, ниже 20 мПа·с при скорости сдвига от примерно 50 до примерно 1000 [1/с] при температуре 5°C.

Пример 14. Стабильность при перемешивании/напряжении сдвига.

Композиции с концентрацией антитела 80 мг/мл, содержащие 5% сорбита, 30 мМ гистидина, pH 5,8, получали с 0, 0,01, 0,05, 0,1% tween 20 и композиции с концентрацией белка 150 мг/мл, содержащие 5% сорбита, 30 мМ гистидина, pH 5,8, получали с 0, 0,01, 0,05, 0,1 и 0,15% TWEEN® 20 (PS20). Эти композиции перемешивали в сдвиговой ячейке или в смесителе в течение вплоть до 24 ч и измеряли невидимые невооруженным глазом частицы с помощью MFI в 0, 4, 8 и 24 ч. Добавление по меньшей мере 0,01% TWEEN® 20 снижало скорость образования невидимых невооруженным глазом частиц по сравнению с композицией без TWEEN®.

Композиции 150 мг/мл антитела, содержащие 5% сорбита, 30 мМ гистидина, pH 5,8, получали с 0, 0,01, 0,05, 0,1% TWEEN® 80 (PS80), и композиции 150 мг/мл белка, содержащие 5% сорбита, 30 мМ гистидина, pH 5,8, получали с 0, 0,01, 0,05, 0,1 и 0,15% TWEEN® 80. Эти композиции перемешивали в течение вплоть до 8 ч и измеряли невидимые невооруженным глазом частицы с помощью MFI в 0, 4, 6 и 8 ч. Добавление по меньшей мере 0,01% TWEEN® 80 снижало скорость образования невидимых невооруженным глазом частиц по сравнению с композицией без TWEEN®.

Предварительные результаты этого дополнительного тестирования, выполненного с 80 и 150 мг/мл белка (антитела) в 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8 с добавлением или TWEEN® 20, или TWEEN® 80 (% мас./об.) показаны (как количество частиц на мл, умноженное на фактор разбавления) на фиг. 3-6. Эти композиции сдвигали/перемешивали для анализа их склонности к образованию невидимых невооруженным глазом частиц в растворе, и было обнаружено, что поверхностно-активные вещества уменьшают образование невидимых невооруженным глазом частиц. Следовательно, поверхностно-активное вещество необходимо для предотвращения образования невидимых невооруженным глазом частиц или будет снижать образование невидимых невооруженным глазом частиц в процессе производства и хранения.

Пример 15. Оценка взаимодействий поверхностно-активных веществ.

Измерения поверхностного натяжения выполняли, чтобы охарактеризовать взаимодействие TWEEN® 20 и TWEEN® 80 с 80 мг/мл белка и 150 мг/мл белка в растворе 5% сорбита, 30 мМ гистидина, pH 5,8. Получали кривые поверхностного натяжения, аналогичные фиг. 7. Определяли критическую концентрацию агрегации (CAC), которая представляет собой концентрацию, при которой поверхностно-активное вещество начинает взаимодействовать с белком. Также определяли критическую концентрацию мицеллообразования (CMC) - концентрацию, указывающую на то, что взаимодействия с белком находятся в состоянии равновесия. Результаты обобщены в табл. 13. TWEEN® 20 и TWEEN® 80 взаимодействуют с белком аналогично, с аналогичными молярными соотношениями CAC поверхностно-активного вещества:белок для обеих концентраций. CMC выше при более высоких концентрациях белка, но молярное соотношение поверхностно-активное вещество:белок аналогично для обеих концентраций белка. TWEEN® 20 имеет более низкое молярное соотношение CMC поверхностно-активного вещества:белок, чем TWEEN® 80. Исходя из измерений поверхностного натяжения, диапазон, в котором поверхностно-активное вещество взаимодействует с белком, находится от CAC вплоть до CMC. Для TWEEN® 20 диапазон молярного соотношения составляет примерно от 0,004 до 2,6, в то время как для TWEEN® 80 диапазон молярного соотношения составляет примерно от 0,003 до 3,3. Оптимальный уровень поверхностно-активного вещества в белковой композиции выше CAC.

Сводка данных кривой поверхностного натяжения

Поверхностно-активное вещество	Концентрация белка (мг/мл)	САС (мг/мл)	СМС (мг/мл)	Молярное соотношение САС поверхностно-активного вещества:белок	Молярное соотношение СМС поверхностно-активного вещества:белок
TWEEN® 20	80	0,0054	1,70	0,008	2,6
TWEEN® 20	150	0,0053	3,18	0,004	2,6
TWEEN® 80	80	0,0045	2,31	0,006	3,3
TWEEN® 80	150	0,0043	3,90	0,003	3,0

САС = критическая концентрация агрегации.

СМС = критическая концентрация мицеллообразования.

Пример 16. Стабильность при замораживании/размораживании.

Композиции 80 мг/мл анти-GM-CSF антитела в 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8, с концентрациями TWEEN® 20 (PS20) и TWEEN® 80 (PS80) 0, 0,01 и 0,1% характеризовали после 10 циклов замораживания/размораживания посредством MFI. Как видно на фиг. 8, наблюдалось значительное увеличение количества частиц  $\geq 10$  мкм при увеличении числа циклов замораживания/размораживания для композиций без поверхностно-активного вещества в них. От 0,01% вплоть до 0,1% TWEEN® 20 или 80 не наблюдалось существенного увеличения количества частиц.

Композиции 150 мг/мл анти-GM-CSF антитела в 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8 с концентрациями TWEEN® 20 и TWEEN® 80, составляющими 0, 0,05 и 0,15%, охарактеризовывали после 10 циклов замораживания/размораживания посредством MFI. Как видно на фиг. 9, для одной из композиций без поверхностно-активного вещества наблюдалось значительное увеличение количества частиц с размером  $\geq 10$  мкм. От 0,05% вплоть до 0,15% TWEEN® 20 или 80 не наблюдалось значительного увеличения количества частиц.

Пример 17. Стабильность в ускоренных условиях.

Композиции 80 мг/мл анти-GM-CSF антитела в 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8 с концентрацией TWEEN® 20 (PS20) и TWEEN® 80 (PS80), равной 0, 0,05, и 0,1% помещали в условия ускоренного испытания стабильности при 40°C в течение 1 недели. Образцы характеризовали посредством MFI (табл. 14) и SE-HPLC (табл. 15).

В течение 1 недели при 40°C не происходило роста частиц  $\geq 10$  мкм при измерении посредством MFI. Однако наблюдалось увеличение мультимерных агрегатов (HMW), измеренное посредством SE-HPLC. Через 7 суток наблюдалось немного повышенное количество HMW-представителей для композиций, содержащих поверхностно-активное вещество, но не значительно больше чем в композиции без поверхностно-активного вещества. Кроме того, рост концентрации HMW не зависел от количества поверхностно-активного вещества или двух разных типов поверхностно-активного вещества.

Таблица 14

Рост концентрации частиц в растворе, содержащем  
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8  
при 40°C в течение 7 суток

Описание композиции	концентрация частиц $\geq 10$ мкм (частицы/мл)		
	0 суток	4 суток	7 суток
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0% PS80	138	1075	69
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,05% PS80	617	91	297
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,1% PS80	0	160	183
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0% PS20	NA	252	23
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,05% PS20	69	69	NA
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,1% PS20	138	23	320

NA = нет данных.

Таблица 15

Результаты SE-HPLC для раствора, содержащего 80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8, при 40°C в течение 7 суток

Описание композиции	HMW			LMW			Мономер		
	0 суток	4 суток	7 суток	0 суток	4 суток	7 суток	0 суток	4 суток	7 суток
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0% PS80	0,76	1,00	1,03	1,6	1,8	1,8	97,7	97,3	97,2
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,05% PS80	0,71	1,06	1,19	1,8	1,9	1,9	97,5	97,1	96,9
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,1% PS80	0,72	1,04	1,19	1,9	1,7	1,9	97,4	97,2	96,9
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0% PS20	0,94	0,94	1,07	1,7	1,8	1,8	97,4	97,3	97,2
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,05% PS20	0,78	1,01	1,16	1,8	1,9	1,8	97,4	97,1	97,1
80 мг/мл анти-GM-CSF антитела +0,1% PS20	0,76	1,06	1,19	1,7	1,8	1,9	97,6	97,1	96,9

Композиции, содержащие 150 мг/мл анти-GM-CSF антитела в 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8, с концентрацией TWEEN® 20 (PS20) и TWEEN® 80 (PS80) 0, 0,1 и 0,15%, подвергали ускоренному тесту на стабильность при 40°C в течение 1 недели. Образцы были охарактеризованы посредством MFI и SE-HPLC.

В течение 1 недели при 40°C не наблюдалось роста концентрации частиц  $\geq 10$  мкм при измерении посредством MFI (Таблица 16). Однако наблюдалось увеличение растворимых агрегатов (HMW) при измерении с помощью SE-HPLC (табл. 17). Скорость роста HMW-представителей выше при 150 мг/мл, чем при 80 мг/мл антитела, но не зависит от количества поверхностно-активного вещества или от типа поверхностно-активного вещества в композиции. При добавлении поверхностно-активного вещества наблюдается незначительное увеличение количества HMW-представителей через семь суток по сравнению с композициями без поверхностно-активного вещества, но оно не является статистически значимым.

Таблица 16

Рост частиц в растворе, содержащем 150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8 при 40°C в течение 7 суток

Описание композиции	концентрация частиц $\geq 10$ мкм (частицы/мл)		
	0 суток	4 суток	7 суток
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0% PS80	137	983	274
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,1% PS80	114	23	23
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,15% PS80	343	46	206
150 мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0% PS20	160	183	92
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,1% PS20	46	183	23
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,15% PS20	23	46	0

Таблица 17

Результаты SE-HPLC раствора, содержащего 150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, pH 5,8, при 40°C в течение 7 суток

Описание композиции	HMW			LMW			Мономер		
	0 суток	4 суток	7 суток	0 суток	4 суток	7 суток	0 суток	4 суток	7 суток
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0% PS80	0,85	1,40	1,53	1,6	1,7	1,9	97,6	96,9	96,6
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,05% PS80	0,81	1,49	1,79	1,7	1,7	2,0	97,5	96,9	96,2
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,1% PS80	0,85	1,54	1,79	1,6	1,8	2,1	97,6	96,7	96,1
150 мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0% PS20	0,97	1,41	1,55	1,6	1,8	1,8	97,4	96,8	96,6
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,1% PS20	0,96	1,37	1,65	1,7	1,7	2,0	97,4	97,0	96,3
150мг/мл анти-GM-CSF антитела + 0,15% PS20	0,98	1,39	1,73	1,6	1,4	2,2	97,4	97,0	96,1

Пример 18. Стабильность в предварительно заполненных шприцах.

Стабильность различных композиций изучали с помощью предварительно заполненных шприцев от трех разных производителей с разными количествами силикона, разными резиновыми деталями и т.д. Кроме того, исследовали плацебо-композиции. Эти композиции помещали при 2-8 и 25°C на период длительностью вплоть до 12 месяцев. Композиции, содержащие белок, антитело (Ab), характеризовали по

внешнему виду, посредством SE-HPLC, катионообменной хроматографии и MFI, в то время как плацебо композиции характеризовали по внешнему виду и посредством MFI.

Исследуемые композиции показаны в табл. 18.

Таблица 18

Условия в предварительно заполненных шприцах для анализа стабильности

Композиция #	Состав	Производитель шприца
1	150 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	A
2	150 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	B
3	150 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	C
4	80 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	A
5	80 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	B
6	80 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	C
7	80 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,02% PS80	A
8	150 мг/мл Ab, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,02% PS80	A
9	30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,02% PS80	A
10	30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	A

Пример 19. Стабильность в предварительно заполненных шприцах.

Стабильность различных композиций с разными концентрациями антитела и количеством полисорбата исследовали с помощью предварительно заполненных шприцев, все из которых являлись типичными шприцами для подкожного введения, от трех разных производителей с разными количествами силиконового масла и разным составом резины, используемой для колпачка для иглы. Одинаковый состав уплотнительного кольца/поршня использовали все три производителя шприцев. Количество полисорбата было выбрано так, чтобы оно было выше САС и находилось на довольно плоской части кривой поверхностного натяжения. Кроме того, исследовали плацебо композиции. Композиции помещали при 2-8 и 25°C для длительного отбора проб. Композиции, содержащие белок, характеризовали по внешнему виду, посредством SE-HPLC, катионообменной хроматографии и MFI, в то время как плацебо композиции характеризовали по внешнему виду и посредством MFI.

Исследуемые композиции показаны в табл. 19, и результаты представлены в табл. 20-26. Композиции, содержащие 80 мг/мл антитела, по внешнему виду были бесцветными, без видимых частиц для всех композиций и типов шприцев, и не менялись с течением времени. Композиции, содержащие 150 мг/мл антитела, по внешнему виду, были слегка желтыми, без видимых частиц для всех композиций и типов шприцев, и не менялись с течением времени. Скорость увеличения агрегатов, определенная посредством SE-HPLC, была выше для композиций 150 мг/мл, чем для композиций 80 мг/мл, количество поверхностно-активного вещества не влияло на скорость агрегации. Изменение профиля заряда с течением времени было одинаковым для всех исследованных композиций и типов шприцев.

Таблица 19

Условия в предварительно заполненных шприцах для анализа стабильности

Композиция #	Состав	Производители шприцев
1	150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	A
2	150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	B
3	150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	C
4	80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	A
5	80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	B
6	80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	C
7	80 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,02% PS80	A
8	150 мг/мл анти-GM-CSF антитела, 30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,02% PS80	A
9	30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,02% PS80	A
10	30 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,04% PS80	A

Таблица 20  
 Результаты SE-HPLC для композиций в предварительно заполненных шприцах,  
 хранящихся при 5±3°C

Композиция #	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация антитела. (мг/мл)	150	150	150	80	80	80	80	150
% PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02
Тип шприца	A	B	C	A	B	C	A	A
%LMW	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,9
	3 мес	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
	6 мес	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,4	0,3
%HWM	0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,8	1,1
	3 мес	1,2	1,2	1,2	1,0	1,0	2,2	1,9
	6 мес	1,5	1,5	1,5	1,2	1,2	2,0	2,0
% Мономера	0	98,8	98,8	98,9	98,9	98,9	98,3	98,4
	3 мес	98,6	98,6	98,6	98,8	98,8	97,5	97,8
	6 мес	98,3	98,4	98,3	98,7	98,6	97,7	97,7

Таблица 21  
 Результаты SE-HPLC для композиций в предварительно заполненных шприцах,  
 хранящихся при 25°C/60%RH (относительная влажность)

Композиция #	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация антитела. (мг/мл)	150	150	150	80	80	80	80	150
% PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02
Тип шприца	A	B	C	A	B	C	A	A
%LMW	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,9
	1 мес	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3
	2 мес	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
	3 мес	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5
	6 мес	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	1,0	0,7
%HWM	0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,8	1,1
	1 мес	1,7	1,6	1,7	1,3	1,2	1,3	1,8
	2 мес	1,9	1,9	1,9	1,4	1,4	2,1	2,6
	3 мес	1,9	1,9	1,9	1,4	1,3	2,6	2,7
	6 мес	2,3	2,3	2,3	1,8	1,6	2,3	3,0
% мономера	0	98,8	98,8	98,8	98,9	98,9	98,3	98,4
	1 мес	98	98	98	98,3	98,4	98,5	97,9
	2 мес	97,7	97,9	97,8	98,2	98,3	97,5	97,0
	3 мес	97,7	97,7	97,7	98,2	98,2	96,8	96,8
	6 мес	97,0	97,1	97,0	97,7	97,7	96,8	96,3

Таблица 22  
 Результаты СЕХ для композиций в предварительно заполненных шприцах,  
 хранящихся при 5±3°C

Композиция #	1	2	3	4	5	6
Концентрация антитела (мг/мл)	150	150	150	80	80	80
% PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Тип шприца	A	B	C	A	B	C
% Кислой	0	42	42	42	42	43
	3 мес	43	42	43	43	43
	6 мес	42	42	42	42	42
% Главной изоформы	0	55	55	55	55	53
	3 мес	54	54	54	54	54
	6 мес	54	54	55	55	55
% Основной	0	2	2	2	2	3
	3 мес	3	3	3	3	3
	6 мес	3	3	3	3	3

Таблица 23

Результаты СЕХ для композиций в предварительно заполненных шприцах, хранящихся при 25°C/60%RH

Композиция #		1	2	3	4	5	6
Концентрация антитела (мг/мл)		150	150	150	80	80	80
% PS 80		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Тип шприца		A	B	C	A	B	C
% Кислой	0	42	42	42	42	42	43
	1 мес	43	43	43	43	43	43
	2 мес	47	46	46	48	48	48
	3 мес	48	47	48	49	49	49
	6 мес	51	52	51	53	53	55
% Главной изоформы	0	55	55	55	55	55	53
	1 мес	53	53	53	53	54	53
	2 мес	50	50	50	48	49	49
	3 мес	48	49	48	47	47	47
	6 мес	44	45	44	43	43	42
% Основной	0	2	2	2	2	2	3
	1 мес	4	4	4	3	3	3
	2 мес	4	4	4	4	3	4
	3 мес	4	4	4	4	4	4
	6 мес	4	4	4	4	4	3

Таблица 24

Результаты по силе при инъекции для композиций в предварительно заполненных шприцах, хранящихся при 5±3°C

Композиция #		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Концентрация антитела. (мг/мл)		150	150	150	80	80	80	80	150	0	0
% PS 80		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	0,04
Тип шприца		A	B	C	A	B	C	A	A	A	A
Максимальная сила, необходимая для начала движения (Н)	0	4,6	5,2	4,7	4,2	4,7	4,5	4,5	4,5	4,3	4,3
	1 мес	4,4	5,0	4,9	4,6	4,5	4,2	4,8	4,8	4,4	4,2
	3 мес	4,3	5,2	4,7	4,2	4,5	4,5	4,3	4,5	3,7	4,3
	6 мес										
Средняя сила трения (Н)	0	9,6	7,1	7,4	5,4	4,4	5,0	5,0	10,1	4,6	4,2
	1 мес	10,4	7,4	8,7	5,8	5,2	5,5	7,1	10,6	4,8	5,2
	3 мес	9,4	6,6	7,5	6,4	5,3	5,1	8,2	8,0	3,8	4,9
	6 мес										

Таблица 25

Результаты по силе при инъекции для композиций в предварительно заполненных шприцах, хранящихся при +25°C/60% RH

Композиция #		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Концентрация антитела (мг/мл)		150	150	150	80	80	80	80	150	0	0
% PS 80		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	0,04
Тип шприца		A	B	C	A	B	C	A	A	A	A
Максимальная сила, необходимая для начала движения (Н)	0	4,6	5,2	4,7	4,2	4,7	4,5	4,5	4,5	4,3	4,3
	1 мес	5,0	6,0	4,6	4,2	5,3	4,8	4,9	4,5	4,3	5,0
	2 мес	4,7	5,5	5,0	4,8	4,1	3,9	4,4	5,2	4,5	3,9
	3 мес	4,5	6,2	4,7	3,8	4,9	4,8	5,2	5,1	5,1	4,7
	6 мес										
Средняя сила трения (Н)	0	9,6	7,1	7,4	5,4	4,4	5,0	5,0	10,1	4,6	4,2
	1 мес	8,7	7,4	8,9	5,3	5,7	6,2	6,6	13,0	4,4	4,2
	2 мес	11,0	7,2	10,5	6,2	4,5	8,1	5,8	12,9	4,7	4,5
	3 мес	10,3	6,7	12,4	6,5	5,6	6,7	7,9	7,9	9,6	4,8
	6 мес										

Результаты по силе при инъекции показали, что средняя сила трения составляет примерно 4-11 Н для каждой композиции и для каждого протестированного шприца. Этот диапазон силы обеспечивает возможность предлагать эти анти-GM-CSF антитела в композициях, описанных в данном документе, как для ручного использования, так и для использования с помощью автоинжектора.

Таблица 26  
 Результаты MFI композиций в предварительно заполненных шприцах,  
 хранящихся при 5±3°C (частицы/мл)

Композиция #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Концентрац. антитела (мг/мл)	150	150	150	80	80	80	80	150	0	0	
% PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,04	
Тип шприца	A	B	C	A	B	C	A	A	A	A	
2-10 мкм	0	6054 5	3173 6	4680 3	5910 5	2032 7	3031 8	1602 57	1155 11	1309 22	1276 06
	1 мес	3998 0	5872 7	8192 5	4715 6	2470 2	6299 7	1220 36	6711 3	1185 16	5312 3
	3 мес	3749 2	3191 0	NV	6761 5	1801 6	5717 7	8927 8	9439 4	1044 89	7045 6
	6 мес	9423 4	3186 4	NV	1352 46	1484 7	6834 1	1050 23	1327 80	1092 08	5411 8
≥10 мкм	0	869	297	1989	137	91	366	1852	3270	4116	1212
	1 мес	979	3771	6658	1056	962	820	2314	743	2596	794
	3 мес	451	275	NV	267	84	580	542	237	1825	1214
	6 мес	817	481	NV	1275	123	1214	1397	825	1710	1262
≥25 мкм	0	0	0	0	0	0	23	69	0	183	46
	1 мес	0	506	168	31	38	8	252	8	115	46
	3 мес	8	8	NV	8	0	23	38	8	46	31
	6 мес	69	15	NV	15	0	8	84	8	8	31

NV - Результаты не достоверны из-за пузырьков воздуха в проточной камере, нет дополнительных доступных образцов.

Таблица 27  
 Результаты MFI для композиций в предварительно заполненных шприцах,  
 хранящихся при 25°C/60% RH (частицы/мл)

Композиция #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Концентрац. антитела (мг/мл)	150	150	150	80	80	80	80	150	0	0	
% PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,04	
Тип шприца	A	B	C	A	B	C	A	A	A	A	
2-10 мкм	0	6054 4	3173 6	4680 3	5910 5	2031 8	3031 8	1602 57	1155 11	1309 22	1276 06
	1 мес	NV	NV	6570 6	6044 5	2283 3	4928 9	8956 2	3874 9	NV	8581 9
	2 мес	4874 7	2265 2	1478 61	1088 64	2659 2	4583 0	1097 65	5346 2	4859 5	9857 1
	3 мес	6145 3	2992 1	7167 6	4802 2	2235 4	8055 8	1322 61	2995 70	1627 58	8420 7
	6 мес	2026 63	4660 9	2581 68	1044 20	NV	2907 67	3182 77	9080 6	8819 4	1156 30
≥10 мкм	0	869	297	1989	137	91	366	1852	3270	4116	1212
	1 мес	NV	NV	2115	520	146	809	1339	742	NV	1840
	2 мес	672	727	7720	1779	558	634	878	644	290	5307
	3 мес	893	1056	1775	817	337	1466	1863	6674	2749	2716
	6 мес	3680	1150	5666	939	NV	7820	2260	519	909	1619
≥25 мкм	0	0	0	0	0	0	23	69	0	183	46
	1 мес	NV	NV	0	23	0	84	69	8	NV	99
	2 мес	8	8	8	38	69	38	0	23	15	84
	3 мес	61	122	8	8	15	31	0	46	31	191
6 мес	61	23	15	31	NV	114	53	31	15	8	

NV - Результаты не достоверны из-за пузырьков воздуха в проточной камере, нет дополнительных доступных образцов.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, содержащая:

1) антитело или его функциональный фрагмент, связывающиеся с GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), где антитело или его функциональный фрагмент представляют собой человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент, которое содержит в своей вариабельной области легкой цепи участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и в своей вариабельной области тяжелой цепи участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13 и 56, и которое присутствует в концентрации от 50 до 200 мг/мл;

2) регулятор тоничности, присутствующий в концентрации от 3 до 7% (мас./об.), где регулятор тоничности представляет собой сорбит;

3) буфер, присутствующий в концентрации от 20 до 40 мМ, где буфер представляет собой гистидиновый буфер; и

4) поверхностно-активное вещество, присутствующее в концентрации от 0,01 до 0,08% (мас./об.), где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80; и где pH составляет от 5 до 7 и где композиция является стабильной.

2. Композиция по п.1, которая дополнительно содержит антиоксидант.

3. Композиция по любому из пп.1, 2, где соотношение полисорбата 80 к белку составляет от 0,3:1 до 0,6:1.

4. Композиция по любому из пп.1-3, которая содержит:

1) от 50 до 180 мг/мл антитела или его функционального фрагмента, связывающихся с GM-CSF;

2) примерно 5% (мас./об.) сорбита;

3) примерно 30 мМ L-гистидина; и

4) от 0,01 до 0,08% (мас./об.) полисорбата 80; и

5) имеет pH примерно 5,8.

5. Композиция по п.4, которая содержит примерно 80 или 150 мг/мл антитела или его функционального фрагмента, связывающихся с GM-CSF.

6. Композиция по п.4 или 5, где соотношение полисорбата 80 к белку составляет от 0,3:1 до 0,6:1.

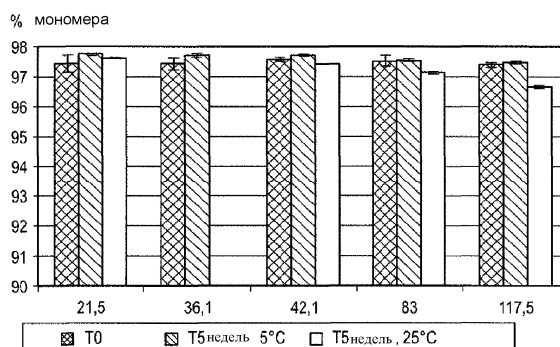
7. Композиция по любому из пп.1-6, которая является жидкой, предпочтительно водной, композицией.

8. Композиция по любому из пп.1-7, где человеческое моноклональное антитело или его функциональный фрагмент, связывающиеся с GM-CSF, содержат в своей вариабельной области тяжелой цепи CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

9. Композиция по любому из пп.1-8, где указанное антитело или его функциональный фрагмент содержат в своей вариабельной области легкой цепи аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 19, 54 и 55, и в своей вариабельной области тяжелой цепи аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 20-33, 52 и 53.

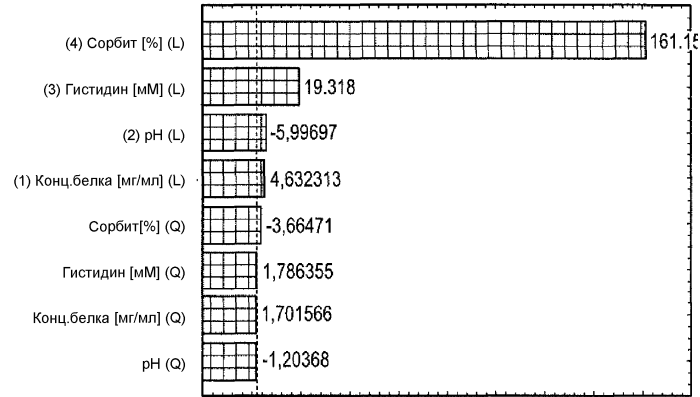
10. Композиция по любому из пп.1-9, где указанное антитело или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 34, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35.

11. Композиция по любому из пп.1-10, которая является стабильной в течение по меньшей мере 24 месяцев при 2-8°C или по меньшей мере 28 суток при комнатной температуре.



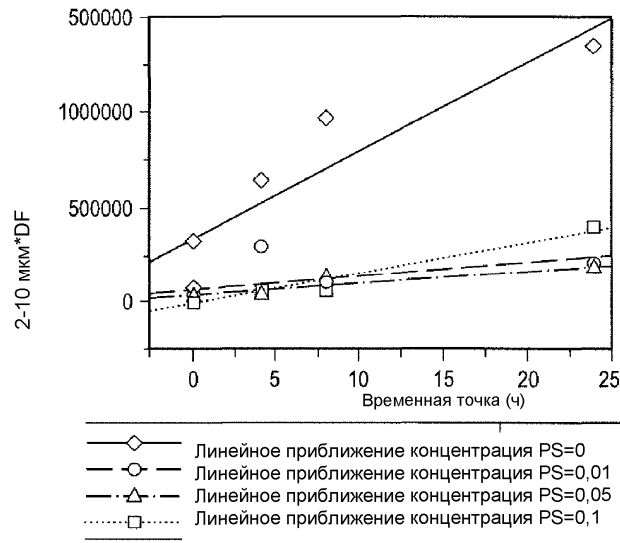
Фиг. 1



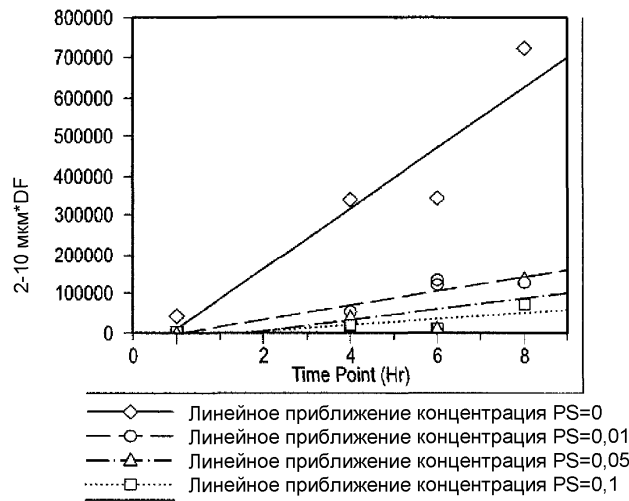


Оценка стандартизованного эффекта (абсолютное значение)

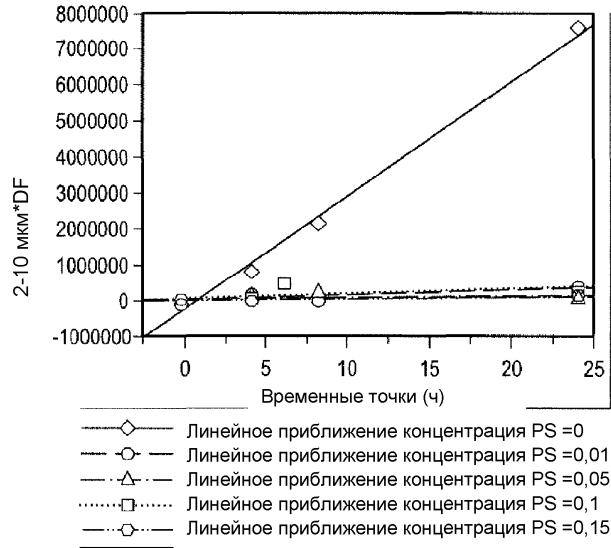
Фиг. 2



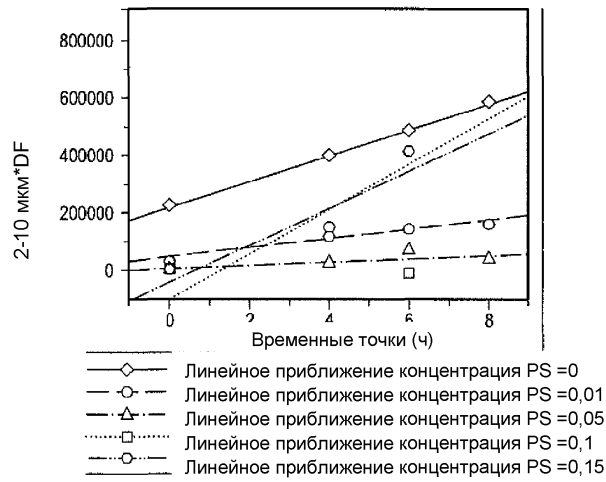
Фиг. 3



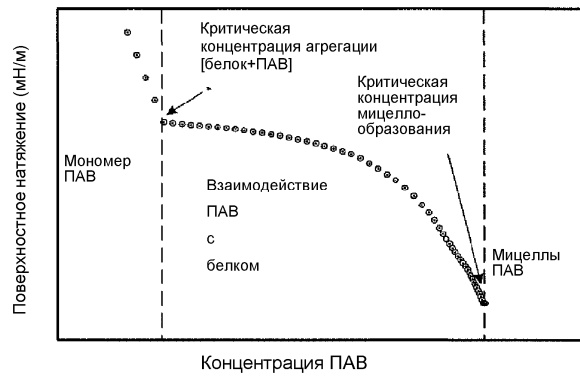
Фиг. 4



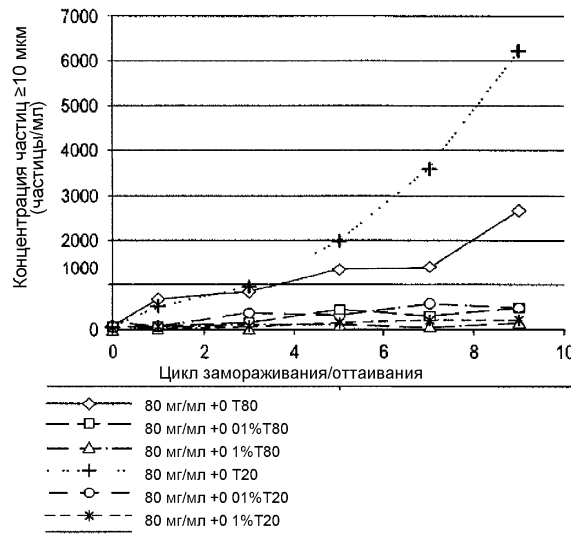
Фиг. 5



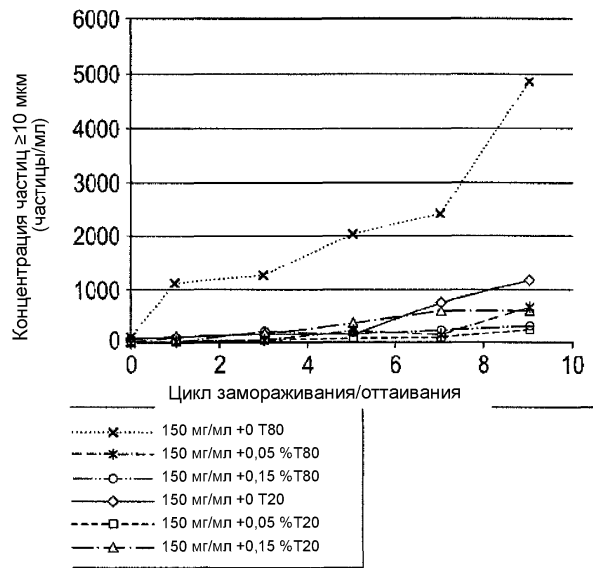
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

