

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193240 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.14

(22) Дата подачи заявки
2020.05.24

(51) Int. Cl. C07K 16/22 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИ-ANGPTL3 АНТИТЕЛА

(31) 62/852,643

(32) 2019.05.24

(33) US

(86) PCT/US2020/034438

(87) WO 2020/243031 2020.12.03

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

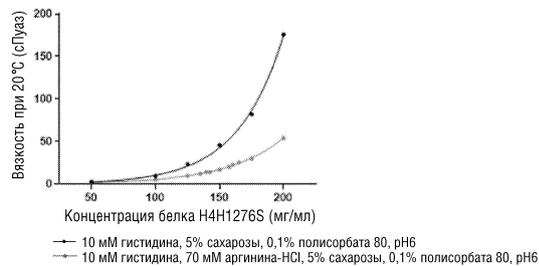
(72) Изобретатель:

Лю Динцзян, Скиннер Андриа (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение представляет стабильные фармацевтические составы, содержащие антитело человека, которое специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 человека (ANGPTL3). Композиции могут содержать, помимо анти-ANGPTL3 антитела, буфер; органический соразтворитель; по меньшей мере один модификатор вязкости и необязательно по меньшей мере одну аминокислоту. Фармацевтические составы по настоящему изобретению можно вводить внутривенной инфузией или подкожно, и они демонстрируют значительную степень стабильности антител после хранения в течение нескольких месяцев.



A1

202193240

202193240

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571713EA/042

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИ-ANGPTL3-АНТИТЕЛА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка подана 24 мая 2020 г. как международная патентная заявка РСТ и испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/852,643, поданной 24 мая 2019 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области терапевтических составов антител. Более конкретно, настоящее изобретение относится к области фармацевтических составов, содержащих антитело человека, которое специфически связывается с ангиопоэтин-подобным (белком) 3 человека (ANGPTL3).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Терапевтические макромолекулы (*например*, антитела) должны быть составлены таким образом, чтобы эти молекулы не только подходили для введения пациентам, но также сохраняли стабильность во время хранения и последующего использования. Например, терапевтические антитела в жидком растворе склонны к деградации, агрегации или нежелательным химическим модификациям, если раствор не составлен должным образом. Стабильность антитела в жидком составе зависит не только от видов эксципиентов, используемых в составе, но также от количества и соотношения эксципиентов по отношению друг к другу. Кроме того, при приготовлении жидкого состава антител необходимо принимать во внимание другие соображения, помимо стабильности. Примеры таких дополнительных соображений включают вязкость раствора и концентрацию антитела, которую может обеспечить данный состав, а также визуальное качество или привлекательность состава. Таким образом, при составлении терапевтического антитела необходимо проявлять большую осторожность, чтобы получить состав, который остается стабильным, содержит адекватную концентрацию антитела и обладает подходящей вязкостью, а также другими свойствами, которые позволяют удобно вводить состав пациентам.

Антитела к ангиопоэтин-подобному белку 3 (ANGPTL3) являются одним из примеров терапевтически релевантной макромолекулы, для которой требуется надлежащий состав. Анти-ANGPTL3 антитела клинически полезны для лечения заболеваний или нарушений, связанных с метаболизмом липидов, сердечно-сосудистых заболеваний или нарушений, а также заболеваний или нарушений, связанных с ангиогенезом.

Аминокислотная и нуклеотидная последовательности ANGPTL3 человека показаны в SEQ ID NO: 161 и 162, соответственно. Типовые анти-ANGPTL3 антитела описаны, например, в US 9,018,356 B2, WO 2008/073300 и US 7,935,796.

Хотя анти-ANGPTL3 антитела известны, в данной области остается потребность в новых фармацевтических составах, содержащих такие антитела, которые достаточно стабильны и подходят для введения пациентам.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для многих коммерциализованных моноклональных антител, конечный вид продукта определяется способом введения. Один из таких способов основан на том, что пациенты предпочитают самостоятельное введение и менее частое дозирование. Самостоятельное введение подкожной инъекции является одним из предпочтительных способов введения парентеральных продуктов, разработанных для длительного лечения многих заболеваний. Подкожные (ПК) инъекции требуют дозирования в общем объеме ≤ 2 мл, предпочтительно, ≤ 1 мл общего объема. Менее частое дозирование требует более высокой концентрации лекарственного средства на дозу и, следовательно, состава с более высокой концентрацией белка. Таким образом, чтобы обеспечить менее частое дозирование, желательны высокие концентрации лекарственного средства (>150 мг на дозу), которые могут быть доставлены в 1 мл. Составы с высокой концентрацией также позволяют использовать меньшие объемы дозирования. Например, для доставки 15 мг/кг лекарственного средства пациенту весом 100 кг, *т.е.* 1500 мг лекарственного средства, необходимо 150 мл препарата с концентрацией 10 мг/мл, тогда как необходимо только 10 мл препарата с концентрацией 150 мг/мл. Таким образом, препараты с высокой концентрацией предпочтительны из-за небольших объемов инъекций, которые они позволяют.

Важно учитывать как стабильность, так и вязкость этого препарата с более высокой концентрацией белка. Поскольку зависимость между концентрацией белка и вязкостью является экспоненциальной, небольшие различия в концентрации белка могут иметь большое влияние на вязкость и влиять на способность пациента доставлять лекарственное средство. На крутизну кривой, изображающей вязкость (ось y) по отношению к концентрации белка (ось x), может повлиять добавление эксципиентов, особенно тех, которые увеличивают (*например*, сахара) или уменьшают (*например*, соли) вязкость, и температура. Кроме того, вязкость напрямую связана со способностью доставлять лекарство через шприц. Силой передвижения является сила, необходимая для непрерывного дозирования содержимого предварительно заполненного шприца. Она измеряется с помощью Syringe Force Tester (Instron). Связь между силой передвижения и вязкостью линейна.

Самостоятельное введение с помощью предварительно заполненного шприца или автоматического шприца требует рецептуры с низкой вязкостью (обычно менее примерно 20 сПуаз). Таким образом, существует необходимость идентифицировать эксципиенты, снижающие вязкость, и оценить их влияние на реологические свойства и стабильность составов антител (в частности, анти-ANGPTL3 антител). Эти данные могут быть использованы для разработки высококонцентрированного жидкого состава на основе аминокислот с приемлемой вязкостью, который можно использовать в предварительно

заполненных шприцах и разработке устройств.

Настоящее изобретение удовлетворяет вышеупомянутую потребность, обеспечивая стабильные фармацевтические составы, содержащие полностью человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 человека (ANGPTL3). H4H1276S является полностью человеческим моноклональным антителом, которое таргетирует ANGPTL3, важный белок, который в активном состоянии ингибирует липопротеинлипазу (LPL). Ингибирование ANGPTL3 с помощью H4H1276S восстанавливает активность LPL и способствует процессингу триглицеридов и vLDL. Таким образом, H4H1276S потенциально показан при нескольких путях заболевания, включая тяжелую гипертриглицеридемию и гомозиготную семейную гиперхолестеринемию.

В одном аспекте, представлен стабильный жидкий фармацевтический состав с высокой концентрацией и низкой вязкостью, содержащий: (i) антитело человека, которое специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 человека (ANGPTL3); (ii) буфер; (iii) органический соразтворитель; и (iv) по меньшей мере, один модификатор вязкости. В одном варианте осуществления, стабильный жидкий фармацевтический состав с высокой концентрацией дополнительно содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту. В другом варианте осуществления, состав содержит стабилизатор. В другом аспекте представлен стабильный жидкий фармацевтический состав с высокой концентрацией и низкой вязкостью, содержащий: (i) антитело человека, которое специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 человека (ANGPTL3); (ii) буфер; (iii) органический соразтворитель; и (iv) по меньшей мере, два модификатора вязкости. В одном варианте осуществления, стабильный жидкий фармацевтический состав с высокой концентрацией дополнительно содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту. В другом варианте осуществления, состав содержит стабилизатор. Термин «модификатор вязкости» включает агенты, снижающие вязкость, или эксципиенты.

В различных вариантах осуществления, антитело представлено в концентрации от примерно $5 \pm 0,75$ мг/мл до примерно $250 \pm 37,5$ мг/мл. В одном варианте осуществления, антитело представлено в концентрации $12,5$ мг/мл $\pm 1,85$ мг/мл или примерно $12,5$ мг/мл. В другом варианте осуществления, антитело представлено в концентрации 25 мг/мл $\pm 3,75$ мг/мл, или примерно 25 мг/мл. В другом варианте осуществления, антитело представлено в концентрации 50 мг/мл $\pm 7,5$ мг/мл или примерно 50 мг/мл. В другом варианте осуществления, антитело представлено в концентрации 100 мг/мл ± 15 мг/мл или примерно 100 мг/мл. В одном варианте осуществления, антитело представлено в концентрации 150 мг/мл $\pm 22,5$ мг/мл или примерно 150 мг/мл. В другом варианте осуществления изобретения, антитело представлено в концентрации 165 мг/мл $\pm 24,75$ мг/мл, или примерно 165 мг/мл. В другом варианте осуществления, антитело представлено в концентрации 175 мг/мл $\pm 26,25$ мг/мл, или примерно 175 мг/мл. В другом варианте осуществления, антитело представлено в концентрации 200 мг/мл ± 30 мг/мл или примерно 200 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления, состав содержит любое из анти-ANGPTL3 антител, описанных в патенте США № 9,018,356B2, включенном в настоящий документ во всей его полноте. В некоторых вариантах осуществления, анти-ANGPTL3 антитело содержит (а) переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи 1, 2 и 3 (HCDR1-HCDR2-HCDR3), каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 72, соответственно; и (b) переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую определяющие комплементарность области легкой цепи 1, 2 и 3 (LCDR1-LCDR2-LCDR3), каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 80, соответственно. В одном варианте осуществления, антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74. В другом варианте осуществления, антитело содержит HCVR, имеющую, по меньшей мере, примерно 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66, и LCVR, имеющую, по меньшей мере, примерно 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 74. В еще одном варианте осуществления, антитело содержит HCVR, имеющую, по меньшей мере, примерно 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66, и LCVR, имеющий, по меньшей мере, примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 74.

В одном варианте осуществления, pH жидкого состава составляет pH $6,0 \pm 0,5$, pH $6,0 \pm 0,4$, pH $6,0 \pm 0,3$, pH $6,0 \pm 0,2$, pH $6,0 \pm 0,1$, pH $6,0 \pm 0,05$, pH $6,0 \pm 0,01$ или pH 6,0. В одном варианте осуществления, pH жидкого состава составляет примерно pH $6,0 \pm 0,3$.

В одном варианте осуществления, буфером является гистидин. В некоторых вариантах осуществления, гистидин присутствует в концентрации от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $50 \text{ мМ} \pm 10 \text{ мМ}$, предпочтительно от $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ до $25 \text{ мМ} \pm 5 \text{ мМ}$. В одном варианте осуществления, гистидин присутствует в концентрации $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$, или $10 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$, или примерно 10 мМ. В другом варианте осуществления, гистидин присутствует в концентрации $20 \text{ мМ} \pm 4 \text{ мМ}$ или $20 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$ или примерно 20 мМ. В еще одном варианте осуществления, гистидин присутствует в концентрации $40 \text{ нМ} \pm 8 \text{ мМ}$, или $40 \text{ нМ} \pm 4 \text{ мМ}$, или примерно 40 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, органическим соразтворителем является неионный полимер, содержащий полиоксиэтиленовый фрагмент. В одном варианте осуществления, органическим растворителем является поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления органическим соразтворителем является один или несколько из полисорбата, полоксамера 188 и полиэтиленгликоля 3350. В одном варианте осуществления, органическим соразтворителем является полисорбат 80. В одном варианте осуществления, органическим соразтворителем является полисорбат 20.

В одном из вариантов осуществления, органический соразтворитель присутствует в концентрации от приблизительно $0,01\% \pm 0,005\%$ до приблизительно $1\% \pm 0,5\%$ «массы к объему» или «масса/объем», где, например, 0,1 г/мл=10% и 0,01 г/мл=1%. В некоторых вариантах осуществления, органическим растворителем является полисорбат в

концентрации от $0,05\% \pm 0,025\%$ до $0,5\% \pm 0,25\%$ (масса/объем). В одном варианте осуществления, органическим соразтворителем является полисорбат 80, концентрация которого составляет $0,2 \pm 0,1\%$ масса/объем или примерно $0,2\%$. В другом варианте осуществления, органическим соразтворителем является полисорбат 80, концентрация которого составляет $0,1\% \pm 0,05\%$ масса/объем или примерно $0,1\%$ масса/объем. В одном варианте осуществления, органическим соразтворителем является полисорбат 20, концентрация которого составляет $0,2 \pm 0,1\%$ масса/объем или примерно $0,2\%$. В другом варианте осуществления, органическим соразтворителем является полисорбат 20, концентрация которого составляет $0,1\% \pm 0,05\%$ масса/объем или примерно $0,1\%$ масса/объем.

В некоторых вариантах осуществления, в состав включен стабилизатор. В одном варианте осуществления, стабилизатором является сахар. В другом варианте осуществления, сахаром является сахароза. В различных вариантах осуществления, стабилизатор находится в концентрации от $1\% + 0,2\%$ масса/объем до $20\% + 4\%$ масса/объем, от $5\% + 1\%$ масса/объем до $15\% + 3\%$ масса/объем, или от $1\% + 0,2\%$ до $10\% + 2\%$ масса/объем. В одном варианте осуществления, стабилизатором является сахароза в концентрации $5\% \pm 1\%$ масса/объем или примерно 5% масса/объем. В другом варианте осуществления, стабилизатором является сахароза в концентрации $9\% \pm 1,8\%$ масса/объем или примерно 9% масса/объем. В другом варианте осуществления, стабилизатором является сахароза в концентрации от 10% до 2% масса/объем или примерно 10% масса/объем.

В одном варианте осуществления, в состав включена, по меньшей мере, одна аминокислота. В одном варианте осуществления, аминокислотой является L-пролин. В некоторых вариантах осуществления, аминокислота находится в концентрации от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ масса/объем. В одном варианте осуществления, аминокислотой является пролин в концентрации $1,5\% \pm 0,3\%$ или примерно $1,5\%$. В одном варианте осуществления, аминокислотой является пролин в концентрации $3\% \pm 0,6\%$ или примерно 3% .

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, одним модификатором вязкости является наполнитель, выбранный из группы, состоящей из: аргинина HCl, хлорида натрия, гистидина HCl, ацетата натрия, хлорида кальция, хлорида магния, ацетата кальция и ацетата магния. В одном варианте осуществления, модификатором вязкости является аргинин HCl. В некоторых вариантах осуществления, модификатор вязкости находится в концентрации от 25 мМ до примерно 75 мМ. В одном варианте осуществления, модификатором вязкости является аргинин HCl в концентрации от 50 мМ до примерно 75 мМ.

В некоторых вариантах осуществления, вязкость жидкого фармацевтического состава при 25°C меньше или равна примерно 20 сПуаз $\pm 10\%$. В некоторых вариантах осуществления, вязкость при 25°C находится в пределах от $1,0$ сПуаз $\pm 10\%$ и 20 сПуаз $\pm 10\%$. В некоторых вариантах осуществления, вязкость жидкого фармацевтического

состава составляет ≤ 15 сПуаз. В некоторых вариантах осуществления, вязкость жидкого фармацевтического состава составляет ≤ 20 сПуаз. В некоторых вариантах осуществления, вязкость жидкого фармацевтического состава составляет ≤ 10 сПуаз. В некоторых вариантах осуществления, вязкость при 25°C составляет 5 сПуаз $\pm 10\%$, 6,0 сПуаз $\pm 10\%$, 7,0 сПуаз $\pm 10\%$, 7,1 сПуаз $\pm 10\%$, 7,2 сПуаз $\pm 10\%$, 7,9 сПуаз $\pm 10\%$, 8,3 сПуаз $\pm 10\%$, 9,0 сПуаз $\pm 10\%$, 9,6 сПуаз $\pm 10\%$, 10,0 сПуаз $\pm 10\%$, 10,6 сПуаз $\pm 10\%$, 11,4 сПуаз $\pm 10\%$, 11,6 сПуаз $\pm 10\%$, 11,8 сПуаз $\pm 10\%$, 12,0 сПуаз $\pm 10\%$, 13,0 сПуаз $\pm 10\%$, 14,0 сПуаз $\pm 10\%$, 15,0 сПуаз $\pm 10\%$ или 16 сПуаз $\pm 10\%$.

В одном аспекте, представлен стабильный жидкий фармацевтический состав с низкой вязкостью, содержащий: (i) от 5 \pm 0,75 мг/мл до 250 \pm 37,5 мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека; (ii) от 0 мМ до 40 \pm 8 мМ гистидина; (iii) от 0% до 0,5% \pm 0,25% (масса/объем) полисорбата 80; (iv) от 50 \pm 10 мМ до 75 \pm 15 мМ аргинина HCl; и (v) от 0 до 5% \pm 1% пролина при pH от примерно 5,3 до примерно 6,7; где анти-ANGPTL3 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), так что комбинация HCVR/LCVR включает определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68-70-72/SEQ ID NO: 76-78-80, соответственно. В одном варианте осуществления, анти-ANGPTL3 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 74, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, анти-PD1 антитело содержит Fc область, выбранную из группы, состоящей из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. В одном варианте осуществления, антитело содержит изоформ IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления, представлен стабильный жидкий фармацевтический состав с низкой вязкостью, содержащий: (i) от 5 \pm 0,75 мг/мл до 250 \pm 37,5 мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека; (b) от 0 мМ до 40+8 мМ гистидина; (iii) от 0% до 0,5% \pm 0,25% (масса/объем) полисорбата 80; (iv) от 50 \pm 10 мМ до 75 \pm 15 мМ аргинина HCl; и (v) от 0 до 5% \pm 1% пролина при pH от примерно 5,3 до примерно 6,7; где анти-ANGPTL3 антитело содержит HCVR и LCVR, где HCVR имеет, по меньшей мере, примерно 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66, и/или LCVR имеет, по меньшей мере, примерно 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления, представлен стабильный жидкий фармацевтический состав с низкой вязкостью, содержащий: (i) от 5 \pm 0,75 мг/мл до 250 \pm 37,5 мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека; (b) от 0 мМ до 40+8 мМ гистидина; (iii) от 0% до 0,5% \pm 0,25% (масса/объем) полисорбата 80; (iv) от 50 \pm 10 мМ до 75 \pm 15 мМ аргинина HCl; и (v) от 0 до 5% \pm 1% пролина при pH от примерно 5,3 до примерно 6,7; где анти-ANGPTL3 антитело содержит HCVR и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, имеющую не

более пяти аминокислотных замен, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 с не более чем двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления, составы любого из предшествующих аспектов имеют признак, выбранный из группы, состоящей из: (i) состав стабилен при длительном хранении при 25°C, 5°C, -20°C, -30°C и -80°C, как описано в настоящем документе; (ii) состав устойчив к стрессу при перемешивании, как описано в настоящем документе; (iii) состав имеет низкую вязкость (вязкость менее примерно 20 сПуаз, предпочтительно менее примерно 15 сПуаз); (iii) состав стабилен даже при изменении концентраций наполнителя до $\pm 50\%$, как описано в настоящем документе; (iv) состав является изо-осмоляльным к физиологическим условиям; (iv) состав стабилен и совместим с устройствами и процедурами для подкожной доставки; и (v) состав стабилен при длительном хранении в предварительно заполненном шприце.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта, представлен стабильный жидкий состав, содержащий: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека; (b) от 5 мМ+1 мМ до 20+4 мМ гистидина; (III) от 0,05% + 0,025% до $0,3\% \pm 0,15\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) от 50 ± 5 мМ до $75 \pm 7,5$ мМ аргинина HCl; и (v) от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ пролина при pH примерно 6,0, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащую пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74. В одном варианте осуществления, стабильный жидкий состав по этому аспекту имеет вязкость менее примерно 20 сПуаз. В другом варианте осуществления, стабильный жидкий состав по этому аспекту имеет вязкость менее примерно 15 сПуаз.

В одном варианте этого аспекта, стабильный жидкий состав содержит (i) $50 \pm 7,5$ мг/мл анти-ANGPTL3 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем.) полисорбата 80; (iv) $3\% + 0,6\%$ пролина; и (v) 70 ± 5 мМ аргинина HCl при pH $6,0 \pm 0,3$, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

В другом варианте осуществления, стабильный жидкий состав содержит (i) 100 ± 15 мг/мл анти-ANGPTL3 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (IV) $3\% + 0,6\%$ пролина; и (v) 70 ± 5 мМ аргинина HCl при pH $6,0 \pm 0,3$, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

В другом варианте осуществления, стабильный жидкий состав содержит (i) $150 \pm 22,5$ мг/мл анти-ANGPTL3 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) 70 ± 5 мМ аргинина HCl; и (v) $3\% \pm 0,6\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74. В одном варианте осуществления описанных в настоящем документе составов, вязкость составляет менее примерно 20 сПуаз, в другом варианте, менее примерно 15 сПуаз.

В другом варианте осуществления этого аспекта, стабильный жидкий состав

содержит (i) $175 \pm 26,25$ мг/мл анти-ANGPTL3 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) 70 ± 5 мМ аргинина HCl; и (v) $3\% \pm 0,6\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

В другом варианте осуществления этого аспекта, стабильный жидкий состав содержит (i) $200 \pm 30,00$ мг/мл анти-ANGPTL3 антитела; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) 70 ± 5 мМ аргинина HCl; и (v) $3\% \pm 0,6\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащую пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

В одном варианте осуществления описанных в настоящем документе составов, состав дополнительно содержит $5\% \pm 1\%$ (масса/объем) сахарозы.

В одном варианте осуществления, после хранения состава при 45° в течение 21 дня \geq примерно 95% антитела является нативным, и \geq примерно 45% антитела имеет форму основного заряда. В одном варианте осуществления, после хранения состава при 5° в течение 36 месяцев $>$ примерно 98% антитела является нативным, и $>$ примерно 55% антитела имеет форму основного заряда. В одном варианте осуществления, после хранения состава при -20° в течение 9 месяцев $>$ примерно 98% антитела является нативным, и $>$ примерно 61% антитела имеет форму основного заряда. В одном варианте осуществления, после хранения состава при -30° в течение 36 месяцев $>$ примерно 98% антитела является нативным, и $>$ примерно 56% антитела имеет форму основного заряда.

Профиль элюирования моноклонального антитела при катионообменной хроматографии обычно включает три пика: пики раннего и позднего элюирования (так называемые кислотные и основные варианты, соответственно), и наиболее распространенный пик (в середине) называется основным пиком (или формой или вариантом основного заряда).

В одном аспекте, жидкий фармацевтический состав любого из предшествующих аспектов представлен в контейнере. В одном варианте осуществления, контейнером является поликарбонатный флакон. В другом варианте осуществления, контейнером является стеклянный флакон. В одном варианте осуществления, стеклянным флаконом является флакон из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой из бутилкаучука, покрытого фторуглеродом. В другом варианте осуществления, контейнером является микроинфузор. В другом варианте осуществления, контейнером является шприц. В другом варианте осуществления, контейнером является предварительно заполненный шприц. В одном варианте осуществления, шприц имеет поршень, покрытый фторуглеродом. В некоторых вариантах осуществления, шприцом является стеклянный шприц длиной 1 мл или 2,25 мл, содержащий менее примерно 500 частей на миллиард вольфрама, оборудованный иглой 27-G, пробкой из бутилкаучука с фторуглеродным покрытием и безлатексным, не цитотоксическим резиновым колпачком наконечника. В одном конкретном варианте осуществления, шприцом является стеклянный шприц длиной 1 мл, снабженный тонкостенной иглой 27-G, покрытой FLUROTEC резиновой пробкой 4023/50 и резиновым

колпачком наконечника FM 27. В другом конкретном варианте осуществления, шприцом является пластиковый шприц на 1 мл или 3 мл, снабженный иглой 27-G. В одном варианте осуществления, пластиковый шприц распределяется BECTON DICKINSON. В другом варианте осуществления, контейнером является прозрачное стекло типа 1 с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой FluroTec®.

В одном аспекте, представлен набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из предыдущих аспектов, контейнер и инструкции по применению. В одном варианте осуществления, контейнером является предварительно заполненный шприц. В одном варианте осуществления, шприцем является длинный стеклянный шприц NUOVA OMPI объемом 1 мл или 2,25 мл, снабженный тонкостенной иглой 27-G, резиновой пробкой 4023/50 с покрытием FLUROTec и резиновым колпачком наконечника FM 27.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении представлен предварительно заполненный шприц, содержащий стабильный жидкий фармацевтический состав, содержащий: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека; (b) от 5 мМ+1 мМ до 20+4 мМ гистидина; (III) от 0,05% + 0,025% до $0,3\% \pm 0,15\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) от 50 ± 10 мМ до 75 ± 15 мМ аргинина HCl; и (v) от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74; где композиция имеет признак, выбранный из группы, состоящей из: (i) \geq примерно 98% антитела находится в нативной форме после хранения при 5°C в течение 36 месяцев; (ii) \geq примерно 55% антитела является вариантом основного заряда после хранения при 5°C в течение 36 месяцев; (iii) композиция устойчива к стрессу, вызываемому перемешиванием, где $\geq 98\%$ антитела находится в нативной форме после 120 минут стресса, вызываемого перемешиванием, в прозрачном стеклянном флаконе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет стабильный жидкий фармацевтический состав, содержащий: (i) от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека; (b) от 5 мМ+1 мМ до 20+4 мМ гистидина; (III) от 0,05% + 0,025% до $0,3\% \pm 0,15\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) от 50 ± 10 мМ до 75 ± 15 мМ аргинина HCl; и (v) от $1\% \pm 0,2\%$ до $5\% \pm 1\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$, где антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74; где композиция имеет признак, выбранный из группы, состоящей из: (i) композиция стабильна и совместима для использования в устройствах для подкожной и/или внутривенной доставки; (ii) состав химически и физически стабилен при разбавлении стандартными разбавителями, известными в данной области (*например*, 0,9% хлоридом натрия или 5% декстрозой); (iii) состав является стабильным для предварительно заполненного шприца или автоматического шприца; и (iv) состав совместим со стандартными инфузионными насосами (*например*, перистальтическим насосом, жидкостным поршневым насосом).

Другие варианты осуществления, станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **фигуре 1** графически показано влияние концентрации H4H1276S на вязкость.

На **фигуре 2** представлена таблица, суммирующая влияние pH на стабильность 150 мг/мл H4H1276S, инкубированного при 45° в течение 28 дней. ^aОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, практически не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^bСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,4\%$ нативного пика SE-UPLC и $\geq 62,7\%$ основного пика по CEX-UPLC во всех 5 составах. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 3** представлена таблица, суммирующая влияние концентрации полисорбата 80 на стабильность 150 мг/мл H4H1276S после перемешивания (120 минут встряхивания). ^aОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, по существу не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^bСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,4\%$ нативного пика SE-UPLC и $\geq 62,7\%$ основного пика по CEX-UPLC во всех 12 составах. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 4** представлена таблица, суммирующая влияние концентрации полисорбата 80 на стабильность 150 мг/мл H4H1276S после инкубации при 45° в течение 28 дней. ^aОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, по существу не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^bСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,4\%$ нативного пика SE-UPLC и $\geq 62,7\%$ основного пика по CEX-UPLC во всех 5 составах. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 5** представлена таблица, суммирующая влияние концентрации полисорбата 80 на образование невидимых частиц для 150 мг/мл H4H1276S после перемешивания (120 минут встряхивания) или инкубации при 45° в течение 28 дней.

^aДанные были отфильтрованы с использованием ECD (мкм) $\geq 5,00$, соотношения сторон $< 0,85$ и фильтра Ignore Edge Particle. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 6** представлена таблица, суммирующая влияние сахарозы и пролина на стабильность H4H1276S после инкубации при -20°C в течение девяти месяцев.

^aСоответствует составу 175 мг/мл H4H1276S, 10 mM гистидина, pH 6,0, 70 mM аргинина HCl. ^bОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, по существу не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^cСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,4\%$ нативного пика SE-UPLC и $\geq 62,7\%$ основного пика по CEX-UPLC во всех 5 составах. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 7** представлена таблица, суммирующая влияние сахарозы и пролина на стабильность H4H1276S после восьми циклов замораживания/оттаивания. ^aСоответствует составу 175 мг/мл H4H1276S, 10 mM гистидина, pH 6,0, 70 mM аргинина HCl. ^bОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, по существу не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^cСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,4\%$ нативного пика SE-UPLC и $\geq 62,7\%$ основного пика по CEX-UPLC во всех 5 составах. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 8** представлена таблица, суммирующая влияние сахарозы и пролина на стабильность H4H1276S после инкубации при 45° в течение 21 дня. ^aСоответствует составу 175 мг/мл H4H1276S, 10 mM гистидина, pH 6,0, 70 mM аргинина HCl. ^bОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, по существу не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^cСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,4\%$ нативного пика SE-UPLC и $\geq 62,7\%$ основного пика по CEX-UPLC во всех 5 составах. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC,

ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 9** представлена таблица, суммирующая влияние сахарозы и пролина на стабильность Н4Н1276S после инкубации при -30°C в течение 36 месяцев. ^aОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, по существу не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^bСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит 98,8% нативного пика по данным SE-UPLC для обоих составов и 59,2% основного пика для состава с сахарозой и 60,0% основного пика для состава пролина, как определено CEX-UPLC. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 10** представлена таблица, в которой суммируется влияние сахарозы и пролина на стабильность Н4Н1276S после инкубации при 5°C в течение 36 месяцев. ^aОбразец передает цвет и внешний вид, если он прозрачный или слегка опалесцирует, по существу не содержит видимых частиц, от бесцветного до бледно-желтого. ^bСообщается как изменение чистоты по сравнению с исходным материалом. Исходный материал (без инкубации) содержит 98,8% нативного пика по данным SE-UPLC для обоих составов и 59,2% основного пика для состава с сахарозой и 60,0% основного пика для состава с пролином, как определено CEX-UPLC. ^cСообщается среднее значение трех независимых выборок. CEX-UPLC, катионообменная сверхэффективная жидкостная хроматография; FDG, Formulation Development Group; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP-UPLC, ультраэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; SE-UPLC, гель-фильтрующая ультраэффективная жидкостная хроматография.

На **фигуре 11** графически представлена зависимость вязкости от концентрации Н4Н1276S для ведущих составов.

На **фигурах 12А и 12В** графически изображена взаимосвязь между концентрацией Н4Н1276S, температурой и вязкостью. Звездочка и кружок при 150 мг/мл Н4Н1276S также соответствуют рекомендуемой температуре хранения 5°C (кружок) или рекомендуемой температуре введения 25°C (звездочка). Звездочка и кружок при 165 мг/мл Н4Н1276S соответствуют рецептуре с производственной спецификацией+10%. Составом на **фигуре 12А** является 10 мМ гистидин, 70 мМ аргинин HCl, 5% сахароза и 0,1% полисорбат 80, pH 6. Составом на **фигуре 12В** является 10 мМ гистидин, 70 мМ аргинин HCl, 3% пролин и 0,1% полисорбат 80, pH 6.

На **фигурах 13А и 13В** представлены гистограммы, показывающие результаты скрининга на наполнители, снижающие вязкость. На **фигуре 13А** вязкость измеряется для различных эксципиентов, добавленных к основному составу, и pH скорректирован для

нескольких вариантов. На фигуре 13B вязкость измерена для различных наполнителей, добавленных к разному основному составу.

На **фигуре 14** показана гистограмма, на которой относительное увеличение НМВ частиц (выраженное в процентах) представлено для различных эксципиентов через 21 день инкубации при 45°C.

На **фигурах 15A и 15B** показана стабильность составов Н4Н1276S, содержащих эксципиенты, снижающие вязкость, в виде гистограммы (фигура 15A) и линейного графика (фигура 15B). На фигуре 15A относительные увеличения НМВ и кислых частиц и вязкости измерены для составов, содержащих 70 мМ Arg HCl по сравнению с 25 мМ Mg (OAc)₂ для различных концентраций сахарозы и/или L-пролина. На фигуре 15B стабильность при хранении в замороженном состоянии (-20°C) измеряется в процентах НМВ частиц с течением времени.

На **фигурах 16A и 16B** представлены контурные графики, показывающие температуру, концентрацию Н4Н1276S и вязкость, как они связаны друг с другом, для препарата, содержащего 10 мМ гистидина, pH 6, 70 мМ Arg HCl и 3% (масса/объем) пролина (фигура 16A); и для препарата, содержащего 10 мМ гистидина, pH 6, 70 мМ Arg HCl и 5% (масса/объем) сахарозы (фигура 16B).

На **фигуре 17** графически показана зависимость вязкости от концентрации Н4Н1276S при 20°C. Вязкость построена как функция от концентрации белка. Данные подогнаны под экспоненциальную кривую с использованием GraphPad Prism. Уравнение (а) можно использовать для прогнозирования вязкости на основе известной концентрации, что полезно для определения производственных спецификаций.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Перед описанием настоящих составов и способов следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными составами и способами, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку такие составы, способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит это изобретение. Используемый в настоящем документе термин «примерно», когда он используется по отношению к конкретному перечисленному числовому значению или диапазону значений, означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, как используется в настоящем документе, выражение «примерно 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (*например*, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.). Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться на практике или при испытании настоящего изобретения, теперь описаны

предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем контексте выражение «фармацевтический состав» означает комбинацию, по меньшей мере, одного активного ингредиента (*например*, малую молекулу, макромолекулу, соединение и *т.д.*, которые способны оказывать биологический эффект на человека или животное, не являющееся человеком), и, по меньшей мере, один не активный ингредиент, который, при объединении с активным ингредиентом или одним или несколькими дополнительными не активными ингредиентами, подходит для терапевтического введения человеку или животному, не являющемуся человеком. Термин «состав», используемый в настоящем документе, означает «фармацевтический состав», если специально не указано иное. Настоящее изобретение представляет фармацевтические составы, содержащие, по меньшей мере, один терапевтический полипептид. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, терапевтическим полипептидом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 человека (ANGPTL3).

Термин «ангиопоэтин-подобный белок 3 человека» или «hANGPTL3» в контексте настоящего описания относится к ANGPTL3, имеющему последовательность нуклеиновой кислоты, показанную в SEQ ID NO: 162, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, или его биологически активный фрагмент.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и константной области тяжелой цепи (C_H; состоит из доменов C_H1, C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (LCVR) и константной области легкой цепи (C_L). HCVR и LCVR могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая HCVR и LCVR состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых для связывания можно обойтись без одной или двух CDR. Padlan, et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только от одной пятой до одной трети остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не содержат аминокислот,

контактирующих с антигеном (см. также Vajdos, et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы из областей CDR Kabat, лежащих вне CDR Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остатки опущены, они обычно заменяются аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в CDR и заменяемые аминокислоты также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут быть консервативными или не консервативными.

Используемый в настоящем документе термин «антитело человека» включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. mAb человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (*например*, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако используемый в настоящем документе термин «антитело человека» не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (*например*, мыши), привиты к последовательностям FR человека.

Полностью человеческие антитела против hANGPTL3, описанные в настоящем документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, происходят из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, где одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных областях и/или CDR областях мутированы до соответствующих остатков последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или соответствующих остатков другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующих остатков зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе вместе именуется «мутациями зародышевой линии»).

Специалист в данной области техники, начиная с описанных в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько индивидуальных обратных мутаций зародышевой линии

или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, все остатки каркасной области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления, только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, *например*, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или несколько остатков каркасной области и/или CDR мутированы до соответствующих остатков другой последовательности зародышевой линии (*т.е.* последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было изначально получено антитело).

Кроме того, описанные в настоящем документе антитела могут содержать любую комбинацию двух или нескольких мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или областях CDR, *например*, где определенные отдельные остатки мутированы до соответствующих остатков конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или заменяются на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать на одно или несколько желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т. д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким образом, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает анти-ANGPTL3 антитела, содержащие варианты любой из описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает анти-ANGPTL3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, *например*, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее, 2 или 1 консервативной аминокислотной заменой относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления, HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 с 10 или меньшим количеством консервативных аминокислотных замен в ней. В другом варианте осуществления, HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 с 8 или меньшим количеством консервативных аминокислотных замен в ней. В другом варианте осуществления, HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 с 6 или меньшим количеством консервативных аминокислотных замен в

ней. В другом варианте осуществления, HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 с 4 или менее консервативными аминокислотными заменами в ней. В еще одном варианте осуществления, HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 с 2 или 1 консервативными аминокислотными заменами в ней. В одном варианте осуществления, LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 с 10 или меньшим количеством консервативных аминокислотных замен в ней. В другом варианте осуществления, LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 с 8 или меньшим количеством консервативных аминокислотных замен в ней. В другом варианте осуществления, LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 с 6 или менее консервативными аминокислотными заменами в ней. В другом варианте осуществления, LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 с 4 или менее консервативными аминокислотными заменами в ней. В еще одном варианте осуществления, LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 с 2 или 1 консервативными аминокислотными заменами в ней.

Если специально не указано иное, термин «антитело», используемый в настоящем документе, следует понимать как охватывающий молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (*m.e.* «полные молекулы антитела»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и подобные, используемые в настоящем документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, *например*, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной геномной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, *например*, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, *например*, библиотеки антител фагового дисплея), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию, или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот, и т. д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные рекогниционные единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (*например*, выделенную определяющую

комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (*например*, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т. д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», используемым в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и обычно содержит, по меньшей мере, одну CDR, которая примыкает или находится внутри рамки с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H домен, связанный с V_L доменом, V_H и V_L домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L димеры. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H или V_L домен.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать, по меньшей мере, один переменный домен, ковалентно связанный с, по меньшей мере, одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (XIV) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из примерных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять, по меньшей мере, из 2 (*например*, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в не ковалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными V_H или V_L доменами (*например*, дисульфидными связями).

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (*например*, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, два разных переменных домена, где каждый переменный домен

способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая иллюстративные форматы биспецифических антител, описанные в настоящем документе, можно адаптировать для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных способов, доступных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагменты антитела, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с терапевтическим компонентом («иммуноконъюгатом»), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоизотоп.

Термин «специфически связывается» и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации (K_D) примерно 1×10^{-6} М или менее (*т.е.* меньшая K_D означает более прочное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и подобные. Выделенное антитело, которое специфически связывается с hANGPTL3, может, однако, проявлять перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы ANGPTL3 других видов, например ANGPTL3 яванского макака, ANGPTL3 мыши, ANGPTL3 крысы и/или hANGPTL4. Более того, мультиспецифические антитела (*например*, биспецифические), которые связываются с hANGPTL3 и одним или несколькими дополнительными антигенами, тем не менее, считаются антителами, которые «специфически связывают» hANGPTL3, как используется в настоящем документе.

Термин « K_D », как используется в настоящем документе, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин «выделенное антитело» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения антитела, которое по существу не содержит других mAb, обладающих другой антигенной специфичностью (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывает hANGPTL3, по существу не содержит mAb, специфически связывающих антигены, отличные от hANGPTL3). Выделенное антитело, которое специфически связывает hANGPTL3, может, однако, обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы ANGPTL3 других видов, таких как яванский макак, мышь, крыса и/или другие родственные белки, такие как ANGPTL4 человека.

Термин «нейтрализующее», «блокирующее» или «отменяющее» антитело, как применяется в настоящем документе (или антитело, которое «нейтрализует», «блокирует» или «отменяет» активность ANGPTL3) предназначено для обозначения антитела,

связывание которого с ANGPTL3 приводит к прямому ингибированию, по меньшей мере, одной биологической активности ANGPTL3, как определено стандартными *in vitro* анализами, известными в данной области техники. Термины, «нейтрализовать», «ингибировать», «блокировать» и «отменять» могут быть использованы в настоящем описании взаимозаменяемо. «Не блокирующее» антитело относится к антителу, связывание которого с ANGPTL3 напрямую не блокирует таргетную активность ANGPTL3, как оценивается стандартными анализами *in vitro*, но все же может быть «интерферирующим» антителом, связывание которого с ANGPTL3 приводит к косвенному ингибированию, снижению, ослаблению или другому вмешательству, по меньшей мере, одной биологической активности ANGPTL3 *in vivo*, *например*, за счет увеличения выведения ANGPTL3 из кровотока. Выведение ANGPTL3 из кровотока может быть особенно усилено комбинацией как минимум двух не блокирующих антител. Нейтрализацию, ингибирование, отмену, снижение, ослабление или вмешательство в биологическую активность ANGPTL3 можно оценить путем измерения одного или нескольких индикаторов биологической активности ANGPTL3 с помощью одного или нескольких стандартных анализов *in vitro* или *in vivo*, известных в данной области техники.

Термин «поверхностный плазмонный резонанс», используемый в настоящем документе, относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биоспецифические взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Термин «эпитоп» относится к участку антигена, который связывается антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подмножество структурных эпитопов и имеют те остатки, которые непосредственно вносят вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е. состоять из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в определенных вариантах осуществления, могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики и/или определенные характеристики заряда.

Термин «существенная идентичность» или «по существу идентичная» применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности в, по меньшей мере, примерно 90%, и более предпочтительно, по меньшей мере, примерно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, по данным любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже.

Применительно к полипептидам, термин «существенное сходство» или «по существу подобная» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, программами GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, имеют, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 95%, 98% или 99% идентичность последовательностей. Предпочтительно, чтобы не идентичные положения остатков различались консервативными аминокислотными заменами. «Консервативной аминокислотной заменой» является замена, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R группу) с аналогичными химическими свойствами (*например*, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или несколько аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, доля или степень сходства может быть увеличена для корректировки консервативного характера замены. Способы выполнения этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., *например*, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативной замены аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее не отрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя меры сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., *например*, GCG версии 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или

рекомендованными; программа в GCG версии 6.1. FASTA (*например*, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивание и долю идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между искомой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000) *выше*). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., *например*, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 402.

Под фразой «терапевтически эффективное количество» подразумевается количество, которое дает желаемый эффект, для которого оно вводится. Точное количество будет зависеть от цели лечения, возраста и размера субъекта, которого лечат, пути введения и подобного, и будет определено специалистом в данной области техники с использованием известных методик (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Биоэквиваленты

Описанные в настоящем документе анти-hANGPTL3 антитела и их фрагменты включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных mAb, но которые сохраняют способность связывать ANGPTL3 человека. Такие варианты mAb и фрагменты антител содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных mAb. Аналогично, описанные в настоящем документе последовательности ДНК, кодирующие анти-hANGPTL3 антитело, включают последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с описанной последовательностью, но которые кодируют анти-hANGPTL3 антитело или фрагмент антитела, который по существу является биоэквивалентным к анти-hANGPTL3 антителу или фрагменту антитела, описанному в настоящем документе. Примеры таких вариантов последовательностей аминокислот и ДНК обсуждались выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значительной разницы при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, будь то единичная доза или многократная доза. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, *например*,

при хроническом применении, и считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата. В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно один или несколько раз переключать между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности, или уменьшение эффективности, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для условия или условий использования в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и *in vitro*. Меры биоэквивалентности включают, *например*, (a) *in vivo* тест на людях или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) *in vitro* тест, который коррелирует с и является средством обоснованного прогнозирования данных биодоступности у человека *in vivo*; (c) *in vivo* тест на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию от времени; и (d) хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность, биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты анти-hANGPTL3 антител по изобретению могут быть сконструированы, например, путем различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не требуются для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации.

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ANGPTL3

Фармацевтические препараты по настоящему изобретению могут содержать антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 человека (ANGPTL3). Типовые анти-ANGPTL3 антитела человека, которые могут быть включены в фармацевтические композиции по настоящему изобретению, описаны в публикациях патентных заявок US 9,018,356B2, WO 2008/073300 и US 7,935,796, описания которых полностью включены посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, анти-ANGPTL3 антитела содержат пары

аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, имеющие SEQ ID NO, выбранные из группы, состоящей из 2/10 («H4H1248P»), 18/26 («H4H1250P»), 34/42 («H4H1263S»), 50/58 («H4H1268S»), 66/74 («H4H1276S»), 82/90 («H4H1279P»), 98/106 («H4H1282P»), 114/122 («H4H1292P»), 130/138 («H4H1295P»), 146/154 («H4H1296P») и 180/188 («H1M896N»).

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, анти-ANGPTL3 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO: 68, HCDR2 с SEQ ID NO: 70, и HCDR3 с SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, анти-ANGPTL3 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR с SEQ ID NO: 66.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, анти-ANGPTL3 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1 с SEQ ID NO: 76, LCDR2 с SEQ ID NO: 78, и LCDR3 с SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления, анти-ANGPTL3 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR с SEQ ID NO: 74.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, анти-ANGPTL3 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, анти-ANGPTL3 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 74.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, анти-ANGPTL3 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, содержащую не более 5 аминокислотных замен.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, анти-ANGPTL3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, содержащую не более 2 аминокислотных замен.

Идентичность последовательности можно измерить любым методом, известным в данной области техники (*например*, GAP, BESTFIT и BLAST).

Настоящее изобретение также включает составы, содержащие анти-ANGPTL3 антитела, где анти-ANGPTL3 антитела содержат варианты любой из описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, содержащие одну или несколько консервативных аминокислотных замен. Например, настоящее изобретение включает составы, содержащие анти-ANGPTL3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативными аминокислотными заменами. относительно любой из аминокислотных

последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, анти-ANGPTL3 антитело содержит Fc область, выбранную из группы, состоящей из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека.

Неограничивающее типовое антитело, используемое в приведенных в настоящем документе примерах, называют «H4H1276S» или «mAb1». Это антитело также упоминается в US 9,018,356B2 как H4H1276S. MAb1 (H4H1276S) содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с доменами SEQ ID NO: 66/74 и HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3, представленными SEQ ID NO: 68-70-72/SEQ ID NO: 76-78-80.

Полноразмерные последовательности H4H1276S следующие:

Последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 195)

EVQLVESGGGVIQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQGPGKGLEWVSAISG
DGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAFFYCAKDLRNTIFGVVIPDA
FDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 196)

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYSYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащегося в фармацевтических составах по настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных желаемых свойств композиций, а также от конкретных обстоятельств и целей, для которых предназначено использование состава. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическими составами являются жидкие составы, которые могут содержать от $5 \pm 0,75$ мг/мл до $250 \pm 37,5$ мг/мл антитела; от $10 \pm 1,5$ мг/мл до 240 ± 36 мг/мл антитела; от $20 \pm 3,0$ мг/мл до $230 \pm 34,5$ мг/мл антитела; от $25 \pm 3,75$ мг/мл до 240 ± 36 мг/мл антитела; от $50 \pm 7,5$ мг/мл до $230 \pm 34,5$ мг/мл антитела; от 60 ± 9 мг/мл до 240 ± 36 мг/мл антитела; $70+10,5$ мг/мл до $230+34,5$ мг/мл антитела; от 80 ± 12 мг/мл до 220 ± 33 мг/мл антитела; от $90 \pm 13,5$ мг/мл до $210 \pm 31,5$ мг/мл антитела; от 100 ± 15 мг/мл до 200 ± 30 мг/мл антитела; от $110 \pm 16,5$ мг/мл до $190 \pm 28,5$ мг/мл антитела; от 120 ± 18 мг/мл до 180 ± 27 мг/мл антитела; от $130 \pm 19,5$ мг/мл до $170 \pm 25,5$ мг/мл антитела; от 140 ± 21 мг/мл до 160 ± 24 мг/мл антитела; $150 \pm 22,5$ мг/мл антитела; или $175+26,25$ мг/мл. Например, составы по настоящему изобретению могут содержать примерно 5 мг/мл; примерно 10 мг/мл; примерно 15 мг/мл; примерно 20 мг/мл; примерно 25 мг/мл; примерно 30 мг/мл; примерно 35 мг/мл; примерно 40 мг/мл; примерно 45 мг/мл;

примерно 50 мг/мл; примерно 55 мг/мл; примерно 60 мг/мл; примерно 65 мг/мл; примерно 70 мг/мл; примерно 75 мг/мл; примерно 80 мг/мл; примерно 85 мг/мл; примерно 90 мг/мл; примерно 95 мг/мл; примерно 100 мг/мл; примерно 105 мг/мл; примерно 110 мг/мл; примерно 115 мг/мл; примерно 120 мг/мл; примерно 125 мг/мл; примерно 130 мг/мл; примерно 135 мг/мл; примерно 140 мг/мл; примерно 145 мг/мл; примерно 150 мг/мл; примерно 155 мг/мл; примерно 160 мг/мл; примерно 165 мг/мл; примерно 170 мг/мл; примерно 175 мг/мл; примерно 180 мг/мл; примерно 185 мг/мл; примерно 190 мг/мл; примерно 195 мг/мл; примерно 200 мг/мл; примерно 205 мг/мл; примерно 210 мг/мл; примерно 215 мг/мл; примерно 220 мг/мл; примерно 225 мг/мл; примерно 230 мг/мл; примерно 235 мг/мл; примерно 240 мг/мл; примерно 245 мг/мл; или примерно 250 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека. В одном варианте осуществления, состав по изобретению содержит примерно 150 мг/мл антитела против ANPTL3 человека или его антигенсвязывающего фрагмента.

ЭКСЦИПИЕНТЫ И pH

Фармацевтические составы по настоящему изобретению содержат один или несколько эксципиентов. Используемый в настоящем документе термин «эксципиент» означает любой не терапевтический агент, добавляемый в состав для обеспечения желаемой консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтический состав по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, один органический соразтворитель того типа и в количестве, которое стабилизирует анти-hANGPTL3 антитело в условиях грубого обращения или взбалтывания, таких как, *например*, встряхивание. В некоторых вариантах осуществления, термин «стабилизирует» означает предотвращение образования более 3% агрегированного антитела от общего количества антитела (на молярной основе) в ходе грубого обращения. В некоторых вариантах осуществления, грубым обращением является встряхивание раствора, содержащего антитело и органический соразтворитель, в течение примерно 60 минут или примерно 120 минут.

В некоторых вариантах осуществления, органическим соразтворителем является неионное поверхностно-активное вещество, такое как алкил поли(этиленоксид). Конкретные неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в составы по настоящему изобретению, включают, *например*, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полуксамеры, такие как полуксамер 181, полуксамер 188, полуксамер 407; или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полисорбат 20 также известен как TWEEN 20, монолаурат сорбитана и монолаурат полиоксиэтиленсорбитана. Полуксамер 188 также известен как PLURONIC F68. В некоторых вариантах осуществления, органическим соразтворителем, входящим в состав по настоящему изобретению, является полисорбат 80.

Количество неионного поверхностно-активного вещества, содержащегося в

фармацевтических композициях по настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных желаемых свойств композиций, а также от конкретных обстоятельств и целей, для которых предназначено использование композиции. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать 0,01% + 0,005% до 0,5% + 0,25% поверхностно-активного вещества. Например, составы по настоящему изобретению могут содержать примерно 0,005%; примерно 0,01%; примерно 0,02%; примерно 0,03%; примерно 0,04%; примерно 0,05%; примерно 0,06%; примерно 0,07%; примерно 0,08%; примерно 0,09%; примерно 0,1%; примерно 0,11%; примерно 0,12%; примерно 0,13%; примерно 0,14%; примерно 0,15%; примерно 0,16%; примерно 0,17%; примерно 0,18%; примерно 0,19%; примерно 0,20%; примерно 0,21%; примерно 0,22%; примерно 0,23%; примерно 0,24%; примерно 0,25%; примерно 0,26%; примерно 0,27%; примерно 0,28%; примерно 0,29%; примерно 0,30%; примерно 0,35%; примерно 0,40%; примерно 0,45%; примерно 0,46%; примерно 0,47%; примерно 0,48%; примерно 0,49%; примерно 0,50%; примерно 0,55%; или примерно 0,575% полисорбата 20 или полисорбата 80. В некоторых вариантах осуществления, состав по настоящему изобретению содержит примерно 0,1% (масса/объем) полисорбата 80.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению могут также содержать один или несколько стабилизаторов того типа и в количестве, которые стабилизируют анти-hANGPTL3 антитело в условиях теплового стресса. В некоторых вариантах осуществления, под «стабилизацией» подразумевается то, что некоторый значительный % антитела в нативной конформации, когда раствор, содержащий антитело и тепловой стабилизатор, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение вплоть до примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления, под «стабилизацией» подразумевается вариант, когда некоторый незначительный % антитела агрегируется, когда раствор, содержащий антитело и тепловой стабилизатор выдерживают при температуре примерно 45°C в течение вплоть до примерно 28 дней. Используемый в настоящем документе термин «нативный» означает основную форму антитела согласно разделению по размеру, которой обычно является интактный мономер антитела. Термин «нативный» также относится к не агрегированной и не деградированной форме антитела.

В некоторых вариантах осуществления, термостабилизатором является сахар, такой как сахароза, количество которого, содержащееся в составе, может варьироваться в зависимости от конкретных обстоятельств и предполагаемых целей, для которых этот состав используется. В некоторых вариантах осуществления, составы могут содержать от примерно 1% до примерно 15% сахара; от примерно 2% до примерно 14% сахара; от примерно 3% до примерно 13% сахара; от примерно 4% до примерно 12% сахара; от примерно 5% до примерно 12% сахара; от примерно 6% до примерно 11% сахара; от примерно 7% до примерно 10% сахара; от примерно 8% до примерно 11% сахара; или от примерно 9% до примерно 11% сахара. Например, фармацевтические составы по настоящему изобретению могут содержать 4% ± 0,8%; 5% + 1%; 6% + 1,2%; 7% + 1,4%; 8% + 1,6%; 9% + 1,8%; 10% + 2%; 11% + 2,2%; 12% + 2,4%; 13% + 2,6%; или примерно

14% + 2,8% сахара (*например*, сахарозы). В некоторых вариантах осуществления, состав по настоящему изобретению не содержит сахар.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также содержать буфер или буферную систему, которая служит для поддержания стабильного pH и помогает стабилизировать анти-hANGPTL3-антитело. В некоторых вариантах осуществления, под «стабилизацией» подразумевается минимизация количества антитела, агрегированного при хранении раствора содержащего антитело и буфер, при температуре примерно 45°C в течение до примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления, под «стабилизацией» подразумевается максимизация количества антитела в его нативной конформации, по данным эксклюзионной хроматографии, когда раствор, содержащий антитело и буфер хранится при температуре примерно 45°C в течение до примерно 28 дней. Под «нативной» или «нативной конформацией» подразумевают фракцию антитела, которая не агрегируется или не деградирует. Обычно это определяют с помощью анализа, который измеряет относительный размер единицы антитела, такого как эксклюзионная хроматография. Не агрегированное и не деградировавшее антитело элюируется во фракции, которая соответствует нативному антителу, и обычно является основной фракцией элюирования. Агрегированные антитела элюируются во фракции, которая указывает на размер больше, чем у нативного антитела. Деградировавшее антитело элюируется с фракцией, которая указывает размер меньше, чем у нативного антитела.

В некоторых вариантах осуществления, под «стабилизацией» подразумевают вариант, где, по меньшей мере, приблизительно 46% от антитела в его форме основного заряда, по данным катионообменной хроматографии, когда раствор, содержащий антитело и буфер, хранится при температуре примерно 45°C в течение примерно до 28 дней. Под «основным зарядом» или «формой основного заряда» подразумевается доля антитела, которая элюируется из ионообменной смолы в основном пике, который обычно фланкируется более «основными» пиками с одной стороны и более «кислотными» пиками с другой стороны.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению могут иметь pH от примерно 5,2 до примерно 6,4. Например, составы по настоящему изобретению могут иметь pH примерно 5,5; примерно 5,6; примерно 5,7; примерно 5,8; примерно 5,9; примерно 6,0; примерно 6,1; примерно 6,2; примерно 6,3; примерно 6,4; или примерно 6,5. В некоторых вариантах осуществления, pH составляет $6,0 \pm 0,4$; $6,0 \pm 0,3$; $6,0 \pm 0,2$; $6,0 \pm 0,1$; примерно 6,0; или 6,0.

В некоторых вариантах осуществления, буфер или буферная система содержит, по меньшей мере, один буфер, диапазон буферизации которого перекрывается полностью или частично с диапазоном pH 5,5-7,4. В некоторых вариантах осуществления, буфер включает гистидиновый буфер. В некоторых вариантах осуществления, гистидин присутствует в концентрации $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ до $15 \text{ mM} \pm 3 \text{ mM}$; $6 \text{ mM} \pm 1,2 \text{ mM}$ до $14 \text{ mM} \pm 2,8 \text{ mM}$; $7 \text{ mM} \pm 1,4 \text{ mM}$ до $13 \text{ mM} \pm 2,6 \text{ mM}$; $8 \text{ mM} \pm 1,6 \text{ mM}$ до $12 \text{ mM} \pm 2,4 \text{ mM}$; $9 \text{ mM} \pm 1,8 \text{ mM}$ до $11 \text{ mM} \pm 2,2 \text{ mM}$; $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$; или примерно 10 mM. В некоторых вариантах

осуществления, буферная система содержит гистидин в количестве $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$, при pH $6,0 \pm 0,3$.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению могут также содержать один или несколько эксципиентов, которые служат для поддержания пониженной вязкости или для снижения вязкости составов, содержащих высокую концентрацию лекарственного вещества анти-ANGPTL3 антитела (*например*, обычно примерно 150 мг/мл антитела). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один модификатор вязкости выбран из группы, состоящей из: аргинина HCl, хлорида натрия, гистидина HCl, ацетата натрия (pH 5), хлорида кальция, хлорида магния, ацетата кальция и ацетата магния. В некоторых вариантах осуществления, составы по настоящему изобретению содержат аргинин HCl.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтический состав включает, по меньшей мере, одну аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотой является пролин, и фармацевтический состав по настоящему изобретению содержит пролин, предпочтительно в виде L-пролина, в концентрации 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5%. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит пролин в количестве, достаточном для поддержания вязкости жидкой композиции на уровне менее 20 ± 3 сПуаз, менее $15 \pm 2,25$ сПуаз или менее $11 \pm 1,65$ сПуаз. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит пролин в количестве, достаточном для поддержания вязкости на уровне $15 \pm 2,25$ сПуаз или ниже. В некоторых вариантах осуществления, составы могут содержать от примерно 1% до примерно 5% пролина; от примерно 2% до примерно 4% пролина; или примерно 3% пролина. Например, фармацевтические составы по настоящему изобретению могут содержать $1\% \pm 0,2\%$; $1,5\% \pm 0,3\%$; $2\% \pm 0,4\%$; $2,5\% \pm 0,5\%$; $3\% \pm 0,6\%$; $3,5\% \pm 0,7\%$; $4\% \pm 0,8\%$; $4,5\% \pm 0,9\%$; или примерно $5\% \pm 1\%$ пролина.

Во время процесса очистки антител может быть желательно или необходимо заменить один буфер на другой, чтобы достичь соответствующих концентраций эксципиента, концентрации антител, pH и т.д. Обмен буфера может осуществляться, *например*, путем ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) с использованием, *например*, полупроницаемой мембраны для фильтрации с тангенциальным потоком. Однако использование таких методов может вызвать эффект Гиббса-Доннана [Bolton et al., 2011, Biotechnol. Prog. 27(1):140-152]. Накопление положительного заряда на стороне продукта мембраны во время концентрирования белка электрически уравнивается за счет преимущественного движения положительных ионов к противоположной стороне мембраны. Потенциальным следствием этого явления является то, что конечные концентрации определенных компонентов (*например*, гистидина, L-пролина и т. д.) могут быть ниже, чем предполагаемые целевые концентрации этих компонентов из-за электростатического отталкивания положительно заряженных эксципиентов буфера диафильтрации к положительно заряженному белку антитела во время стадии UF/DF. Таким образом, настоящее изобретение включает составы, в которых концентрация,

например, гистидина и/или L-пролина варьируется от указанных в настоящем документе количеств или диапазонов из-за эффекта Гиббса-Доннана.

Исключение объема описывает поведение высококонцентрированных образцов, в которых значительная часть общего объема раствора занята растворенным веществом, особенно большими молекулами, такими как белки, за исключением растворителя из этого пространства. Это затем уменьшает общий объем растворителя, доступного для растворения других растворенных веществ, что может привести к неравномерному распределению через ультрафильтрационную мембрану. Таким образом, настоящее изобретение включает составы, в которых концентрация, *например*, гистидина и/или L-пролина, может отличаться от указанных в настоящем документе количеств или диапазонов из-за эффекта исключения объема.

Во время изготовления составов настоящего изобретения могут происходить изменения в композиции состава. Эти изменения могут включать концентрацию активного ингредиента, концентрацию эксципиентов и/или pH состава. Поскольку изменения любого из этих параметров могут потенциально повлиять на стабильность или эффективность лекарственного препарата, были проведены исследования подтвержденного допустимого диапазона (PAR), чтобы оценить, будут ли изменения в композиции в определенных диапазонах влиять на стабильность или эффективность антитела. Соответственно, настоящее изобретение включает составы, содержащие анти-ANGPTL3 антитела, которые являются стабильными и сохраняют активность при изменении концентрации наполнителя вплоть до 50%. Например, в настоящий документ включены составы анти-ANGPTL3 антител, в которых на стабильность и эффективность указанных составов не подвержена влиянию $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, $\pm 30\%$, $\pm 40\%$ или $\pm 50\%$ изменение концентрации антитела, гистидина, Аргинина HCl и/или полисорбата.

СТАБИЛЬНОСТЬ И ВЯЗКОСТЬ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ

Фармацевтические составы по настоящему изобретению обычно демонстрируют высокие уровни стабильности. Термин «стабильный», используемый в настоящем документе в отношении фармацевтических составов, означает, что антитела в фармацевтических составах сохраняют приемлемую степень химической структуры или биологической функции после хранения при определенных условиях. Состав может быть стабильным, даже если содержащееся в нем антитело не сохраняет 100% своей химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного времени. При определенных обстоятельствах, сохранение примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% структуры или функции антитела после хранения в течение определенного времени может рассматриваться как «стабильное».

Стабильность можно измерить, *среди прочего*, путем определения доли нативного антитела, которая остается в составе после хранения в течение определенного времени при определенной температуре. Доля нативного антитела может быть определена, *среди прочего*, эксклюзионной хроматографией (*например*, эксклюзионной ультраэффективной

жидкостной хроматографией [SE-UPLC]), так что нативное означает не агрегированное и не деградировавшее. «Приемлемая степень стабильности», так как эта фраза используется в настоящем описании, означает, что, по меньшей мере, 90% нативной формы антитела могут быть обнаружены в композиции после хранения в течение определенного промежутка времени при заданной температуре. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, примерно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нативной формы антитела могут быть обнаружены в композиции после хранения в течение определенного времени при определенной температуре. Определенное количество времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять, по меньшей мере, 14 дней, по меньшей мере, 28 дней, по меньшей мере, 1 месяц, по меньшей мере, 2 месяца, по меньшей мере, 3 месяца, по меньшей мере, 4 месяца, по меньшей мере, 5 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, по меньшей мере, 7 месяцев, по меньшей мере, 8 месяцев, по меньшей мере, 9 месяцев, по меньшей мере, 10 месяцев, по меньшей мере, 11 месяцев, по меньшей мере, 12 месяцев, по меньшей мере, 18 месяцев, по меньшей мере, 24 месяца или более. Определенная температура, при которой фармацевтический состав может храниться при оценке стабильности, может быть любой температурой от примерно -80°C до примерно 4°C . 5°C , *например*, хранение при температуре примерно -80°C , примерно -30°C , примерно -20°C , примерно 0°C , примерно 4°C – 8°C , примерно 5°C , примерно 25°C , примерно 35°C , примерно 37°C или примерно 45°C . Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если после 6 месяцев хранения при 5°C SE-UPLC обнаруживает более 95%, 96%, 97% или 98% нативных антител. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после 6 месяцев хранения при 25°C SE-UPLC обнаруживает более 95%, 96%, 97% или 98% нативных антител. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после 28 дней хранения при 45°C SE-UPLC обнаруживает более 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% или 96% нативных антител. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после 12 месяцев хранения при -20°C SE-UPLC обнаруживает более 96%, 97% или 98% нативных антител. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после 12 месяцев хранения при -30°C SE-UPLC обнаруживает более 96%, 97% или 98% нативных антител. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после 12 месяцев хранения при -80°C SE-UPLC обнаруживает более 96%, 97% или 98% нативных антител.

Стабильность может быть измерена, *среди прочего*, определением долевого содержания антитела, которое образуется в агрегате в составе после хранения в течение определенного времени при определенной температуре, где стабильность обратно пропорциональна доле образовавшегося агрегата. Доля агрегированного антитела может быть определена, *среди прочего*, эксклюзионной хроматографией (*например*, эксклюзионной ультраэффективной жидкостной хроматографией [SE-UPLC]). «Приемлемая степень стабильности», как эта фраза используется в настоящем документе, означает, что не более 5% антитела находится в агрегированной форме (также

обозначаемой как высокомолекулярная - HMW - форма), обнаруживаемой в составе после хранения в течение определенного количества времени при данной температуре. В некоторых вариантах осуществления, приемлемая степень стабильности означает, что не более примерно 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела может быть определено в агрегате в составе после хранения в течение определенного количества времени при данной температуре. Определенное количество времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере, 2 недели, по меньшей мере, 28 дней, по меньшей мере, 1 месяц, по меньшей мере, 2 месяца, по меньшей мере, 3 месяца, по меньшей мере, 4 месяца, по меньшей мере, 5 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, по меньшей мере, 7 месяцев, по меньшей мере, 8 месяцев, по меньшей мере, 9 месяцев, по меньшей мере, 10 месяцев, по меньшей мере, 11 месяцев, по меньшей мере, 12 месяцев, по меньшей мере, 18 месяцев, по меньшей мере, 24 месяца или более. Температура, при которой фармацевтический состав может храниться при оценке стабильности, может быть любой температурой от примерно -80°C до примерно 45°C, *например*, хранение при примерно -80°C, примерно -30°C, примерно -20°C, примерно 0°C, примерно 4-8°C, примерно 5°C, примерно 25°C, примерно 35°C, примерно 37°C или примерно 45°C. Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после 12 месяцев хранения при 5°C, менее чем примерно 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела обнаруживается в агрегированной форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после трех месяцев хранения при 25°C, менее примерно 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела обнаруживается в агрегированной форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после 28 дней хранения при 45°C менее примерно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, или 0,5% антитела обнаруживается в агрегированной форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после трех месяцев хранения при -20°C, -30°C или -80°C менее примерно 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела обнаруживается в агрегированной форме.

Стабильность можно измерить, *среди прочего*, путем определения доли антитела, которое мигрирует в более кислой фракции во время ионного обмена («кислая форма»), чем в основной фракции антитела («форма основного заряда»), где стабильность обратно пропорциональна фракции антитела в кислой форме. Не желая связывать себя теорией, дезамидирование антитела может привести к тому, что антитело станет более отрицательно заряженным и, следовательно, более кислым по сравнению с не дезамидированным антителом (см., *например*, Robinson, N., Protein Deamidation, PNAS, April 16, 2002, 99(8):5283-5288). Доля «подкисленного» антитела может быть определена, *среди прочего*, с помощью ионообменной хроматографии (*например*, катионообменной ультраэффективной жидкостной хроматографии [CEX-UPLC]). «Приемлемая степень стабильности», так как эта фраза используется в настоящем описании, означает, что не более 45% от антитела находится в более кислой форме, обнаруженной в композиции после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре.

В некоторых вариантах осуществления, приемлемая степень стабильности означает, что самое большее примерно 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела может быть обнаружено в кислой форме в составе после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре. В одном варианте осуществления, приемлемая степень стабильности означает, что менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела могут быть обнаружены в кислой форме в составе после хранения в течение определенного количества времени при данной температуре. Определенное время, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере, 2 недели, по меньшей мере, 28 дней, по меньшей мере, 1 месяц, по меньшей мере, 2 месяца, по меньшей мере, 3 месяца, по меньшей мере, 4 месяца, по меньшей мере, 5 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, по меньшей мере, 7 месяцев, по меньшей мере, 8 месяцев, по меньшей мере, 9 месяцев, по меньшей мере, 10 месяцев, по меньшей мере, 11 месяцев, по меньшей мере, 12 месяцев, по меньшей мере, 18 месяцев, по меньшей мере, 24 месяца или более. Температура, при которой фармацевтический состав может храниться при оценке стабильности, может быть любой температурой от примерно -80°C до примерно 45°C , *например*, хранение при температуре примерно -80°C , примерно -30°C , примерно -20°C , примерно 0°C , примерно 4°C - 8°C , примерно 5°C , примерно 25°C или примерно 45°C . Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если после трех месяцев хранения при -80°C , -30°C или -20°C менее примерно 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после шести месяцев хранения при 5°C менее примерно 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после шести месяцев хранения при 25°C менее чем примерно 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если после 28 дней хранения при 45°C менее примерно 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела могут быть обнаружены в более кислой форме.

Другие способы могут быть использованы для оценки стабильности составов по настоящему изобретению, такие как, *например*, дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) для определения термической стабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности и поглощение при примерно

350 нм или примерно 405 нм для определения мутности раствора. Например, композиция по настоящему изобретению может считаться стабильной, если через 6 или более месяцев хранения при температуре от примерно 5°C до примерно 25°C изменение OD₄₀₅ состава составляет менее примерно 0,05 (*например*, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или меньше) от OD₄₀₅ состава в нулевой момент времени.

Измерение биологической активности или аффинности связывания антитела с его мишенью также можно использовать для оценки стабильности. Например, состав по настоящему изобретению можно рассматривать как стабильный, если после хранения, *например*, при 5°C, 25°C, 45°C и т.д. в течение определенного периода времени (*например*, от 1 до 12 месяцев) анти-ANGPTL3 антитело, содержащееся внутри композиции, связывается с ANGPTL3 с аффинностью, которая составляет, по меньшей мере, 90%, 95% или более от аффинности связывания антитела до указанного хранения. Аффинность связывания может быть определена, *например*, с помощью ELISA или поверхностного плазмонного резонанса. Биологическая активность может быть определена с помощью анализа активности ANGPTL3, такого как, *например*, контакт клетки, экспрессирующей ANGPTL3, с составом, содержащим анти-ANGPTL3 антитело. Связывание антитела с такой клеткой можно измерить напрямую, *например*, с помощью анализа FACS. Альтернативно, активность системы ANGPTL3 может быть измерена в присутствии антитела и сравнена с активностью системы ANGPTL3 в отсутствие антитела. В некоторых вариантах осуществления, ANGPTL3 может быть эндогенным по отношению к клетке. В других вариантах осуществления, ANGPTL3 может эктопически экспрессироваться в клетке.

Дополнительные способы оценки стабильности антитела в составе продемонстрированы в примерах, представленных ниже.

Жидкие фармацевтические составы по настоящему изобретению могут в некоторых вариантах осуществления, иметь уровни вязкости от низкого до среднего. Используемый в настоящем документе термин «вязкость» может означать «кинематическую вязкость» или «абсолютную вязкость». «Кинематическая вязкость» является мерой резистивного потока текучей среды под действием силы тяжести. Когда две текучие среды равного объема помещают в одинаковые капиллярные вискозиметры и позволяют течь под действием силы тяжести, вязкой жидкости требуется больше времени, чем менее вязкой жидкости, чтобы течь через капилляр. Например, если одной жидкости требуется 200 секунд, чтобы завершить свое течение, а другой жидкости требуется 400 секунд, вторая жидкость будет в два раза более вязкой, чем первая, по шкале кинематической вязкости. «Абсолютная вязкость», иногда называемая динамической или простой вязкостью, является произведением кинематической вязкости и плотности жидкости (Абсолютная вязкость=кинематическая вязкость x плотность). Размерность кинематической вязкости составляет L²/T где L - длина, а T - время. Обычно кинематическая вязкость выражается в сантистоксах (сСт). Единицей кинематической вязкости в системе СИ является мм²/с, что составляет 1 сСт. Абсолютная вязкость

выражается в единицах сантипуазах (сПуаз). Единицей измерения абсолютной вязкости в системе СИ является миллиПаскаль-секунда (мПа-с), где 1 сПуаз=1 мПа-с.

Используемый в настоящем документе термин «низкий уровень вязкости» применительно к жидкой композиции по настоящему изобретению будет иметь абсолютную вязкость менее примерно 20 сПуаз (сПуаз). Например, жидкий состав по изобретению будет считаться имеющим «низкую вязкость», если, при измерении с использованием стандартных методов измерения вязкости, состав демонстрирует абсолютную вязкость примерно 20 сПуаз, примерно 19 сПуаз, примерно 18 сПуаз, примерно 15 сПуаз, примерно 12 сПуаз, примерно 10 сПуаз, примерно 9 сПуаз, примерно 8 сПуаз или меньше. В настоящем документе, средний уровень вязкости по отношению к жидкому составу по настоящему изобретению будет демонстрировать абсолютную вязкость в диапазоне от примерно 35 сПуаз и примерно 20 сПуаз. Например, жидкий состав по настоящему изобретению будет считаться имеющим «умеренную вязкость», если при измерении с использованием стандартных методов измерения вязкости состав демонстрирует абсолютную вязкость примерно 34 сПуаз, примерно 33 сПуаз, примерно 32 сПуаз, примерно 31 сПуаз, примерно 30 сПуаз, примерно 29 сПуаз, примерно 28 сПуаз, примерно 27 сПуаз, примерно 26 сПуаз, примерно 25 сПуаз, примерно 24 сПуаз, примерно 23 сПуаз, примерно 22 сПуаз, примерно 21 сПуаз, примерно 20 сПуаз, примерно 19 сПуаз, 18 сПуаз, примерно 17 сПуаз, примерно 16 сПуаз или примерно 15,1 сПуаз.

Как проиллюстрировано в приведенных ниже примерах, авторы настоящего изобретения сделали неожиданное открытие, что жидкие составы с низкой вязкостью, содержащие высокие концентрации анти-ANGPTL3 антитела человека (*например*, от примерно 50 мг/мл до, по меньшей мере, 250 мг/мл), могут быть получены путем составления рецептуры антитела с пролином от примерно 1% до примерно 5% и без необходимости в стабилизаторе, таком как сахароза. Такие составы устойчивы к нагрузкам при обращении и хранении при температурах от 45°C до -80°C (показано в настоящем документе) и показывают вязкость ниже примерно 15 сПуаз.

ТИПОВЫЕ СОСТАВЫ

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, фармацевтический состав является стабильным, низкой вязкости, обычно физиологическим изотоническим жидким составом, который включает: (i) антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с ANGPTL3 человека (*например*, H4H1276S), в концентрации от примерно 25 до примерно 250 мг/мл; (ii) буферную систему, которая обеспечивают достаточную буферизацию при pH примерно $6,0 \pm 0,3$; (iii) органический соразтворитель, который защищает структурную целостность антитела; и (iv) модификатор вязкости, которым является эксципиент, снижающий вязкость. Согласно другому аспекту настоящего изобретения, фармацевтический состав является стабильным, низкой вязкости, обычно физиологически изотоническим жидким составом, который включает: (i) антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с ANGPTL3 человека (*например*, H4H1276S), в концентрации

от примерно 25 до примерно 250 мг/мл; (ii) буферную систему, которая обеспечивает достаточную буферизацию при pH примерно $6,0 \pm 0,3$; (iii) органический соразтворитель, который защищает структурную целостность антитела; (iv) модификатор вязкости, который является эксципиентом, снижающим вязкость; и (v) аминокислоту, которая служит для поддержания управляемой вязкости для инъекции в удобном объеме для подкожного введения.

Согласно одному варианту осуществления, стабильный фармацевтический состав с низкой вязкостью содержит: (i) антитело IgG4 человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека и которое содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 68, HCDR2 с SEQ ID NO: 70, HCDR3 с SEQ ID NO: 72, LCDR1 с SEQ ID NO: 76, LCDR2 с SEQ ID NO: 78, и LCDR3 с SEQ ID NO: 80, при концентрации 25 мг/мл+7,5 мг/мл; (ii) гистидин в количестве 10 мМ+2 мМ, который является буфером при pH $6,0 \pm 0,3$; (iii) полисорбат 80 в количестве 0,1% масса/объем+0,05% масса/объем; (iv) 70 ± 5 мМ аргинина HCl; и (v) L-пролин в количестве примерно 3% (масса/объем) $\pm 0,6\%$. В другом варианте осуществления, антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

Согласно другому варианту осуществления, стабильный фармацевтический состав с низкой вязкостью содержит (i) антитело IgG4 человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека и которое включает HCDR1 с SEQ ID NO: 68, HCDR2 с SEQ ID NO: 70, HCDR3 с SEQ ID NO: 72, LCDR1 с SEQ ID NO: 76, LCDR2 с SEQ ID NO: 78, и LCDR3 с SEQ ID NO: 80, при концентрации 50 мг/мл+7,5 мг/мл; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) $3\% + 0,6\%$ пролина; и (v) 70 ± 5 мМ аргинина HCl при pH $6,0 \pm 0,3$. В другом варианте осуществления, антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

Согласно другому варианту осуществления, стабильный фармацевтический состав с низкой вязкостью содержит (i) антитело IgG4 человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека и которое включает HCDR1 с SEQ ID NO: 68, HCDR2 с SEQ ID NO: 70, HCDR3 с SEQ ID NO: 72, LCDR1 с SEQ ID NO: 76, LCDR2 с SEQ ID NO: 78 и LCDR3 с SEQ ID NO: 80 в концентрации 100 ± 15 мг/мл; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) $3\% + 0,6\%$ пролина; и (v) 70 ± 5 мМ аргинина HCl при pH $6,0 \pm 0,3$. В другом варианте осуществления, антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

Согласно другому варианту осуществления, стабильный фармацевтический состав с низкой вязкостью содержит (i) антитело IgG4 человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека и которое включает HCDR1 с SEQ ID NO: 68, HCDR2 с SEQ ID NO: 70, HCDR3 с SEQ ID NO: 72, LCDR1 с SEQ ID NO: 76, LCDR2 с SEQ ID NO: 78 и LCDR3 с SEQ ID NO: 80 в концентрации $150 \pm 22,5$ мг/мл; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) 70 ± 5 мМ аргинина HCl; и (v) $3\% \pm 0,6\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$. В другом варианте осуществления, антитело содержит

HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74. В некоторых вариантах осуществления составов, описанных в настоящем документе, вязкость составляет менее примерно 20 сПуаз; в дополнительных вариантах осуществления, вязкость композиции составляет менее примерно 15 сПуаз.

Согласно другому варианту осуществления, стабильный фармацевтический состав с низкой вязкостью содержит (i) антитело IgG4 человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека и которое включает HCDR1 с SEQ ID NO: 68, HCDR2 с SEQ ID NO: 70, HCDR3 с SEQ ID NO: 72, LCDR1 с SEQ ID NO: 76, LCDR2 с SEQ ID NO: 78 и LCDR3 с SEQ ID NO: 80 в концентрации $175 \pm 26,25$ мг/мл; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) 70 ± 5 мМ аргинина HCl; и (v) $3\% \pm 0,6\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$. В другом варианте осуществления, антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

Согласно другому варианту осуществления, стабильный фармацевтический состав с низкой вязкостью содержит (i) антитело IgG4 человека, которое специфически связывается с ANGPTL3 человека и которое включает HCDR1 с SEQ ID NO: 68, HCDR2 с SEQ ID NO: 70, HCDR3 с SEQ ID NO: 72, LCDR1 с SEQ ID NO: 76, LCDR2 с SEQ ID NO: 78 и LCDR3 с SEQ ID NO: 80 в концентрации $200 \pm 30,00$ мг/мл; (ii) 10 ± 2 мМ гистидина; (iii) $0,1\% \pm 0,05\%$ (масса/объем) полисорбата 80; (iv) 70 ± 5 мМ аргинина HCl; и (v) $3\% \pm 0,6\%$ пролина при pH $6,0 \pm 0,3$. В другом варианте осуществления, антитело содержит HCVR/LCVR, содержащие пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74.

Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтических составов, охватываемые настоящим изобретением, изложены в настоящем документе в других местах, включая рабочие примеры, представленные ниже.

КОНТЕЙНЕРЫ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержаться в любом контейнере, подходящем для хранения лекарственных средств и других терапевтических композиций. Например, фармацевтические препараты могут содержаться в запечатанном и стерилизованном пластиковом или стеклянном контейнере определенного объема, таком как флакон, ампула, шприц, картридж или флакон. Различные типы флаконов могут быть использованы, чтобы содержать составы по настоящему изобретению, в том числе, *например*, прозрачные и не прозрачные (*например*, янтарные) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогичным образом, любой тип шприца может быть использован для содержания или введения фармацевтических составов по настоящему изобретению.

Фармацевтические препараты по настоящему изобретению могут содержаться в шприцах с «нормальным содержанием вольфрама» или шприцах с «низким содержанием вольфрама». Специалистам в данной области техники будет понятно, что процесс изготовления стеклянных шприцев обычно включает использование горячего вольфрамового стержня, который пробивает стекло, тем самым создавая отверстие, через которое жидкости могут всасываться и выталкиваться из шприца. Этот процесс приводит

к отложению следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца. Последующая промывка и другие этапы обработки могут использоваться для уменьшения количества вольфрама в шприце. Используемый в настоящем документе термин «нормальное содержание вольфрама» означает, что шприц содержит больше или равно 500 частей на миллиард (ч./млрд.) вольфрама. Термин «низкое содержание вольфрама» означает, что шприц содержит менее 500 частей на миллиард вольфрама. Например, шприц с низким содержанием вольфрама согласно настоящему изобретению может содержать менее примерно 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или менее ч./млрд. вольфрама.

Резиновые поршни, используемые в шприцах, и резиновые пробки, используемые для закрытия отверстий флаконов, могут иметь покрытие для предотвращения загрязнения лекарственного содержимого шприца или флакона или для сохранения их стабильности. Таким образом, фармацевтические составы по настоящему изобретению в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, могут содержаться в шприце, который содержит поршень с покрытием, или во флаконе, закрытом резиновой пробкой с покрытием. Например, поршень или стопор могут быть покрыты фторуглеродной пленкой. Примеры пробок или поршней с покрытием, подходящих для использования с флаконами и шприцами, содержащими фармацевтические составы по настоящему изобретению, упомянуты, *например*, в патентах США №№ 4,997,423; 5,908,686; 6,286,699; 6,645,635; и 7,226,554, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Конкретные примеры резиновых пробок и поршней с покрытием, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, коммерчески доступны под торговым наименованием «FluroTec®», доступным от West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA). FluroTec® является примером фторуглеродного покрытия, используемого для минимизации или предотвращения прилипания лекарственного препарата к резиновым поверхностям.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, фармацевтические составы могут содержаться в шприце с низким содержанием вольфрама, который содержит поршень, покрытый фторуглеродом.

Фармацевтические составы могут быть введены пациенту парентеральными путями, такими как инъекция (*например*, подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутрибрюшинная и т.д.) или чрескожное, слизистое, назальное, легочное или пероральное введение. Для подкожной доставки фармацевтических составов по настоящему изобретению можно использовать многочисленные многоцветные шприц-ручки или автоматические шприцы. Примеры включают, но не ограничены ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson,

Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany). Примеры одноразовых шприцов или автоматических шприцов, применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоматический шприц SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL).

В настоящем документе также рассматривается использование микроинфузора для доставки фармацевтических составов по настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин «микроинфузор» означает устройство для подкожной доставки, предназначенное для медленного введения больших объемов (*например*, до примерно 2,5 мл или более) терапевтического состава в течение длительного периода времени (*например*, примерно 10, 15, 20, 25, 30 или более минут). См., *например*, US 6,629,949; US 6,659,982; и Meehan et al., J. Controlled Release 46:107-116 (1996). Микроинфузоры особенно полезны для доставки больших доз терапевтических белков, содержащихся в высоких концентрациях (*например*, примерно 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл) или вязких растворов.

В некоторых вариантах осуществления, стабильный жидкий фармацевтический состав по любому из предыдущих аспектов содержится в стерильном стеклянном флаконе и вводится в виде ВВ инфузии.

В одном варианте осуществления, контейнером является пузырек из прозрачного боросиликатного стекла типа 1 на 20 мл. В некоторых вариантах осуществления, контейнером является 2 мл или 3 мл флакон из боросиликатного стекла типа 1 с бутылкаучуковой пробкой 4432/50, покрытой FluroTec®.

В одном варианте осуществления, жидкий фармацевтический состав по настоящему изобретению, содержащий примерно 25 мг/мл или 50 мг/мл mAb1, вводится внутривенно и может содержаться в стеклянном флаконе.

В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет автоматический шприц, содержащий любой из жидких составов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, настоящего изобретения предлагается автоматический шприц, содержащий стабильный жидкий состав, содержащий примерно 50 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 150 мг/мл или примерно 175 мг/мл mAb1, примерно 10 mM гистидина, при pH примерно 6,0, примерно 70 mM аргинина HCl, примерно 3% пролина и примерно 0,1% полисорбата 80.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет предварительно заполненный шприц, содержащий любой из жидких составов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, настоящего изобретения представляет предварительно заполненный шприц, содержащий стабильный жидкий состав, содержащий примерно 50 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 150 мг/мл или примерно 175 мг/мл mAb1, примерно 10 mM гистидина, при pH примерно 6,0, примерно

70 мМ аргинина HCl, примерно 3% пролина и примерно 0,1% полисорбата 80. В некоторых вариантах осуществления, шприцем является стеклянный шприц длиной 1 мл или 2,25 мл, имеющий тонкостенную иглу 27 калибра, резиновый поршень, покрытый фторуглеродом, и резиновый колпачок для иглы.

В одном варианте осуществления, жидкий фармацевтический состав, содержащий примерно 175 мг/мл+26,25 мг/мл mAb1, вводят подкожно в объеме примерно до 2 мл в предварительно заполненном шприце. В некоторых вариантах осуществления, шприцем является стеклянный шприц длиной 1 мл или 2,25 мл, имеющий тонкостенную иглу 27 калибра, резиновый поршень с фторуглеродным покрытием и резиновый колпачок для иглы. В одном варианте осуществления, шприцем является стеклянный шприц OMP1 длиной 1 мл, имеющий иглу 27 калибра, резиновый колпачок для иглы FM27 и резиновый поршень 4023/50 с покрытием FLUROTEC®.

В одном варианте осуществления, изобретения жидкий фармацевтический состав, содержащий примерно 150 мг/мл+22,5 мг/мл mAb1, вводят подкожно в объеме от примерно 1 до примерно 2 мл в предварительно заполненном шприце. В одном варианте осуществления, шприцем является стеклянный шприц длиной 1 мл или 2,25 мл, имеющий тонкостенную иглу 27 калибра, резиновый поршень с фторуглеродным покрытием и резиновый кожух для иглы. В одном варианте осуществления, шприцем является стеклянный шприц OMP1 длиной 1 мл, имеющий иглу 27 калибра, резиновый колпачок для иглы FM27 и резиновый поршень 4023/50 с покрытием FLUROTEC®.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ

Фармацевтические составы по настоящему изобретению полезны, *среди прочего*, для лечения, профилактики или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного с активностью ANGPTL3, включая заболевания или нарушения, опосредованные ANGPTL3. Заболеванием или нарушением, которое можно лечить с использованием составов по настоящему изобретению, является любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, подавляется или предотвращается, или частота его возникновения снижается по сравнению с таковой без лечения анти-hANGPTL3 антителом (*например*, опосредованные ANGPTL3 заболевания или нарушения) путем удаления, ингибирования, снижения или иного вмешательства в активность ANGPTL3.

Примеры заболеваний или нарушений, которые можно лечить с использованием составов по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, заболевания, связанные с метаболизмом жиров, такие как гиперлипидемия, гиперлипопротеинемия и дислипидемия, включая атерогенную дислипидемию, диабетическую дислипидемию, гипертриглицеридемию, включая тяжелую гипертриглицеридемию с уровнем триглицеридов >1000 мг/дл, гиперхолестеринемия, хиломикронемия, смешанная дислипидемия, диабет, липодистрофия и подобные, которые вызваны, например, сниженной активностью LPL и/или дефицитом LPL, сниженной

активностью рецептора LDL (LDLR) и/или дефицитом рецептора LDL (*например*, гомозиготная семейная гиперхолестеринемия с LDLR^{-/-}), измененным ApoC2, дефицитом ApoE, повышенным ApoB, повышенным продуцированием и/или пониженной элиминацией липопротеинов очень низкой плотности (VLDL), определенным лекарственным лечением (*например*, дислипидемия, вызванная лечением глюкокортикоидами), любой генетической предрасположенностью, диетой, образом жизни и подобными. Составы по настоящему изобретению могут также предотвращать или лечить заболевания или нарушения, связанные с гиперлипидемией, гиперлипопротеинемией и/или дислипидемией или являющиеся их результатом, включая, помимо прочего, сердечно-сосудистые заболевания или нарушения, такие как атеросклероз, аневризма, гипертензия, стенокардия, инсульт, цереброваскулярные заболевания, застойная сердечная недостаточность, заболевания коронарной артерии, инфаркт миокарда, заболевания периферических сосудов и подобные; острый панкреатит; неалкогольный стеатогепатит (НАСГ); нарушения уровня сахара в крови, такие как диабет; ожирение, и подобные.

Другие примеры заболеваний или нарушений, которые можно лечить с использованием композиций по настоящему изобретению, включают рак/опухоль, а также не опухолевые заболевания или нарушения, связанные с ангиогенезом, включая глазные ангиогенные заболевания или нарушения, такие как возрастная дегенерация желтого пятна, окклюзия центральной вены сетчатки или окклюзия ветвей сетчатки, диабетическая ретинопатия, ретинопатия недоношенных и подобные, воспалительные заболевания или нарушения, такие как артрит, ревматоидный артрит (RA), псориаз и подобные.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры представлены для того, чтобы предоставить обычным специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создавать и использовать способы и композиции по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (*например*, количества, температуры и *т.д.*), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются мольными частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура дана в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному давлению.

Пример 1: Разработка состава анти-ANGPTL3 антитела

Для более поздних стадий клинического развития планируется как ВВ, так и ПК введение более высоких доз. Таким образом, исследования по разработке состава были проведены с целью разработки жидкого состава 150 мг/мл, который можно использовать как для ВВ, так и для ПК введения. Для доставки доз H4H1276S вплоть до 450 мг с помощью одной или двух ПК инъекций требуется жидкий состав с высокой концентрацией. Для ВВ введения жидкий состав с высокой концентрацией также является предпочтительным, поскольку он позволяет добавлять меньший объем DP в пакет для ВВ

вливания. Это поддерживает использование таких высоких доз, как 15 мг H4H1276S на кг массы тела пациента.

Первоначальные действия по разработке состава для лиофилизованного состава H4H1276S проводят при низкой концентрации белка (5-50 мг/мл H4H1276S) и они включают оценку буферов, pH, органических соразтворителей, поверхностно-активных веществ и сахарозы для определения эксципиентов, повышающих стабильность белка. С учетом знаний, полученных при первоначальной разработке состава, деятельность по разработке состава для жидкого состава 150 мг/мл включает оценку эксципиентов, снижающих вязкость, pH, поверхностно-активного вещества и термостабилизаторов для определения эксципиентов, которые повышают стабильность белка при более высоких концентрациях белка от 150 и 200 мг/мл H4H1276S, сохраняя раствор с приемлемой вязкостью.

При разработке состава, три первичных состояния белкового стресса (представляющих экстремальные условия обращения, за пределами которых лекарственный продукт антитела не будет подвергаться во время обработки, производства, транспортировки, хранения и маркировки) используют для разработки и оптимизации составов антител и для оценки влияния потенциальных реально существующих стрессов на стабильность лекарственного препарата. Эти стрессовые условия включают:

- перемешивание (встряхивание) белкового раствора при комнатной температуре. Встряхивание в стеклянных флаконах превосходит перемешивание, которое происходит во время обработки и производства белка.

- инкубацию раствора белка при повышенной температуре (37°C, 40°C или 45°C) относительно предлагаемого условия хранения DP (2°C-8°C).

- многократные циклы замораживания-размораживания белка. Поскольку белок подвергается, по меньшей мере, одному циклу замораживания-размораживания во время производства DP, несколько циклов замораживания-размораживания имитируют и превышают фактический стресс, который, как ожидается, будет испытывать белок.

Анти-ANGPTL3 антитела: Анти-ANGPTL3 антитела описаны в патенте США 9,018,356 B2, который полностью включен в настоящий документ. Типовое антитело, используемое в примерах ниже, является полностью человеческим анти-ANGPTL3 антителом H4H1276S (как описано в '356), содержащим пару аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи HCVR/LCVR, содержащую SEQ ID NO: 66/74; и последовательности определяющих комплементарность областей CDR тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 68/70/72/76/78/80; и в настоящем документе также обозначается как «mAb1».

Пример 2: Типовые составы

В некоторых вариантах осуществления, mAb1 составляются в виде водного забуференного состава, содержащего от 5 мг/мл+0,75 мг/мл до 250 мг/мл+45,0 мг/мл mAb1, 10 mM+2 mM гистидина, 0,1% + 0,05% масса/объем полисорбата, от 50 до 75 mM

аргинина HCl и 1% + 0,02% до 5% + 1% масса/объем пролина, при pH 6,0+0,3. Примеры составов включают: 150 мг/мл H4N1276S, 10 mM гистидина, pH 6,0, 70 mM аргинина HCl, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 и 3% (масса/объем) пролина.

Пример 3: Способы, используемые для оценки стабильности состава

Физическая стабильность состава относится к таким свойствам, как цвет, внешний вид, pH, мутность и концентрация белка. Химическая стабильность относится к образованию частиц с высокой молекулярной массой (HMW), частиц с низкой молекулярной массой (LMW), вариантов, отличающихся зарядами, и других химических модификаций белка. Физическую и химическую стабильность лекарственного препарата антитела (например, H4N1276S) оценивают с помощью следующих анализов:

- Цвет и внешний вид при визуальном осмотре (можно обнаружить присутствие видимых частиц в растворе)
- pH
- Мутность измеряется увеличением оптической плотности (OD) при 405 нм.
- Анализ частиц, не видимых невооруженным глазом, Micro-Flow Imaging™ (MFI)
- Концентрация белка с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-UPLC), выраженная как доля восстановления белка относительно исходного материала
- Чистота по следующим анализам:
 - Эксклюзионная ультраэффективная жидкостная хроматография (SE-UPLC)
 - Капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия (MCE-SDS) с восстановленным и не восстановленным микрочипом
 - Анализ вариантов, отличающихся зарядами:
 - Катионообменная UPLC (CEX-UPLC)
 - Динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование (iCIEF)
 - Эффективность с помощью биоанализа:
 - Относительную эффективность каждого образца определяют биологическим анализом и определяют как: $(IC_{50} \text{ эталонного образца} / IC_{50} \text{ образца}) * 100\%$. Измеренная активность образцов стабильности при хранении должна находиться в пределах от 50% до 150% от измеренной активности эталонного стандарта.

Для химической стабильности состава, оценивают образование ковалентно модифицированных форм (*например*, ковалентных агрегатов, продуктов расщепления или форм с вариантами, отличающимися зарядами) и не ковалентно модифицированных форм (*например*, не ковалентных агрегатов) белка. Продукты деградации с более высокой и низкой молекулярной массой могут быть отделены от нативных антител методами SE-UPLC и MCE-SDS.

Пример 4: Выбор агента для снижения вязкости

Чтобы понять, как на вязкость влияет увеличение концентраций H4N1276S, готовят составы с различными концентрациями белка в 10 mM гистидине, pH 6,0, 5% сахарозы и 0,1% полисорбате 80. Этот состав эквивалентен составу, впервые

используемому для человека (ФИН), используемому для ВВ введения при начальных клинических исследованиях. Вязкость каждого образца измеряют при 20°C, и результаты показаны на Фигуре 1 (верхняя кривая). Измеренная вязкость при 150 мг/мл составляет больше 40 сантипуаз (сПуаз), что значительно выше целевой приемлемой вязкости 20 сПуаз. Таким образом, было высказано предположение, что для получения препарата с целевой концентрацией белка 150 мг/мл и приемлемой вязкостью требуется использование эксципиента, снижающего вязкость.

Для определения подходящего эксципиента, снижающего вязкость, исследуют влияние выбранных вспомогательных веществ на вязкость состава Н4Н1276S. Включенными эксципиентами являются аргинин HCl, хлорид натрия, гистидин HCl, ацетат натрия, хлорид кальция, хлорид магния, ацетат кальция и ацетат магния. Добавление 70 мМ аргинина HCl уменьшает вязкость при всех протестированных концентрациях белка (фигура 1, нижняя кривая). Было обнаружено, что аргинин HCl является наиболее эффективным средством снижения вязкости по сравнению с другими эксципиентами. Кроме того, это оказало минимальное влияние на стабильность. Эксципиенты, тестированные на снижение вязкости, представлены в Таблице 1 ниже. Аргинин HCl выбирают для дополнительных исследований по разработке, поскольку он предоставляет адекватное снижение вязкости. Последующие исследования по разработке составов включают 70-75 мМ аргинин HCl для определения оптимального pH, концентрации поверхностно-активного вещества и термостабилизатора.

Таблица 1: Эксципиенты, протестированные на снижение вязкости

Эксципиент	Диапазон концентраций	Влияние на вязкость	Влияние на стабильность
Аргинин HCl	50-75 мМ	Значительное снижение	Минимальное
Хлорид натрия	50-75 мМ	Значительное снижение	Минимальное
Гистидин HCl	40-65 мМ	Снижение	Не тестирован
Ацетат натрия, pH 5	40-60 мМ	Значительное снижение	Пониженная стабильность
Хлорид кальция	25 мМ	Значительное снижение	Минимальное
Хлорид магния	25 мМ	Значительное снижение	Минимальное
Ацетат кальция	25 мМ	Значительное снижение	Минимальное
Ацетат магния	25 мМ	Значительное	Минимальное

Экципиент	Диапазон концентраций	Влияние на вязкость	Влияние на стабильность
		снижение	

Пример 5: Выбор pH

Влияние pH на термическую стабильность H4N1276S исследуют в жидких составах путем инкубации 150 мг/мл H4N1276S при 45°C в течение 28 дней при различных интервалах pH в 10 мМ гистидина, либо с 5% (масса/объем) сахарозы, либо с 2% (масса/объем) пролина. Сахарозу и пролин рассматривают как потенциальные термостабилизаторы и включают для того, чтобы влияние буфера и pH можно было изучить с помощью композиции состава, которая является более типовой для конечного состава. Основываясь на результатах анализов SE-UPLC и CEX-UPLC (таблица 2, как показано на фигуре 2), более высокий pH минимизирует образование HMW частиц, а более низкий pH минимизирует образование вариантов, отличающихся зарядами. Гистидиновый буфер с pH 6,0 выбирают в качестве буфера для состава, поскольку он представляет лучший баланс между образованием HMW частиц и образованием варианта, отличающегося зарядом.

Пример 6: Оптимизация концентрации поверхностно-активного вещества

Поверхностно-активные вещества часто добавляют в составы антител для защиты белка от агрегации, вызванной перемешиванием. При разработке исходного лиофилизируемого состава, образование HMW частиц наблюдают при перемешивании 50 мг/мл H4N1276S. Добавление 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 защищает H4N1276S от нестабильности, вызванной перемешиванием. Однако, концентрация белка, содержание термостабилизатора и присутствие других эксципиентов могут влиять на восприимчивость белка к стрессу, вызванному перемешиванием. Таким образом, было оценено минимальное количество полисорбата 80, необходимое для защиты 150 мг/мл H4N1276S от стресса, вызванного перемешиванием. Концентрации полисорбата 80 0,0%, 0,02%, 0,05% и 0,1% (% масса/объем) исследуют в присутствии 5% сахарозы, 2% сахарозы и 1,3% пролина или 2% пролина (% масса/объем). Образцы составляют в 10 мМ гистидине, pH 6, с 70 мМ аргинином, чтобы они были более типовыми для конечного состава. Результаты представлены в таблицах 3, 4 и 5 (как показано на фигурах 3, 4 и 5 соответственно).

При перемешивании в течение 120 минут (таблица 3, как показано на фигуре 3) наблюдают значительное увеличение содержания HMW (4,8-6,3%) для составов без поверхностно-активного вещества. Добавление 0,02% (масса/объем) полисорбата 80 является недостаточным для защиты H4N1276S от нестабильности, вызванной перемешиванием, в то время как 0,05% (масса/объем) полисорбата 80 и выше обеспечивают адекватную стабилизацию, независимо от термостабилизатора, включенного в состав. Данные демонстрируют, что, по меньшей мере, 0,05% (масса/объем) полисорбата 80 требуется для защиты H4N1276S от нестабильности,

вызванной перемешиванием, и что при наличии, по меньшей мере, 0,05% (масса/объем) полисорбата 80, на нестабильность, вызванную перемешиванием, не влияет выбор термостабилизатора. Добавление полисорбата 80 не влияет на образование НМВ частиц Н4Н1276S при инкубации при 45°C, независимо от термостабилизатора, включенного в состав (таблица 4, как показано на фигуре 4). Относительное изменение НМВ частиц от $t=0$ для составов без термостабилизатора было сравнимо с таковыми с полисорбатом. Увеличение НМВ частиц варьируется от 3,1-3,2%, 3,5-3,8% и 3,8-4,1% для композиций, содержащих только сахарозу, сахарозу и пролин или только пролин, соответственно.

При сравнении групп термостабилизаторов, Н4Н1276S показывает умеренно улучшенную стабильность при составлении с сахарозой (по сравнению с пролином) и инкубации в стрессовых условиях. Однако различие не было сочтено значимым. Различия в общем относительном изменении распределения вариантов, отличающихся зарядами, от $t=0$ для всех оцениваемых составов считаются находящимися в пределах изменчивости анализа. Влияние перемешивания и инкубации при 45°C на образование частиц оценивают с использованием MFI, и результаты показаны в таблице 5 (как показано на фигуре 5). Не было заметной тенденции в образовании частиц, что позволяет предположить, что на образование частиц не влияет концентрация полисорбата 80 или термостабилизатора, включенного в состав. Хотя стабилизация достигается при концентрации полисорбата 0,05% (масса/объем), 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 выбирают в качестве концентрации поверхностно-активного вещества. Более высокая концентрация полисорбата обеспечивает устойчивость состава, имеет эквивалентную стабильность 0,05% (масса/объем) состава полисорбата и представляет дополнительную стабилизацию при разбавлении в пакете для ВВ вливания.

Пример 7: Влияние термостабилизатора

Стабилизаторы могут быть добавлены в составы антител для повышения стабильности белка в жидких составах и во время хранения в замороженном виде. Сахароза включалась в качестве термостабилизатора в предыдущие составы. Однако сахароза также может увеличивать вязкость раствора. Поэтому пролин оценивают в качестве термостабилизатора в надежде, что он может повлиять на растворимость и коллоидную стабильность белка для улучшения стабильности при хранении состава продукта моноклонального антитела, без увеличения вязкости конечного состава (таблица 6 ниже).

Таблица 6: Вязкость при 20°C для составов Н4Н1276S с разными концентрациями сахарозы и пролина

Композиция состава	С	Т	П	И
--------------------	---	---	---	---

Композиция состава							ос ть пр и
Н4Н1276S (мг/мл)	Гистидин (мМ)	pH	Полисорбат 80 (% масса/объем)	Аргинин HCl (мМ)	Сахароза (% масса/объем)	Пролин (% масса/объем)	
150	10	6	0,1	70	5	0	15,3
150	10	6	0,1	70	3	1	14,8
150	10	6	0,1	70	2	1,5	14,0
150	10	6	0,1	70	0	2	13,1

Чтобы поддержать выбор компонентов для составленной нерасфасованной композиции лекарственного вещества и оценить необходимость присутствия термостабилизатора в составе, стабильность 175 мг/мл Н4Н1276S в 10 мМ гистидина, pH 6,0 и 70 мМ аргинина HCl (без сахарозы или пролина) оценивают путем оценки стабильности при хранении в замороженном виде при -20°C и стабильности при замораживании/размораживании (замораживание при -30°C и размораживание при комнатной температуре) (таблицы 7 и 8 (показаны на фигурах 6 и 7, соответственно). Несмотря на то, что -30°C является предполагаемым условием долгосрочного хранения для составленного лекарственного вещества, стабильность при хранении в замороженном состоянии при -20°C оценивают как условия ускоренного замороженного хранения для разработки. Увеличение количества НМВ частиц на 7,2% наблюдают после инкубации при -20°C в течение 9 месяцев (таблица 7, показанная на фигуре 6). В то время как для этого состава наблюдается небольшое увеличение количества НМВ после 8 циклов замораживания/размораживания (таблица 8, показанная на фигуре 7), данные о стабильности при хранении в замороженном состоянии при температуре -20°C указывают на необходимость в термостабилизаторе для поддержания долгосрочного хранения замороженного нерасфасованного лекарственного вещества.

Чтобы идентифицировать и оптимизировать концентрацию термостабилизаторов в жидком составе, 150 мг/мл Н4Н1276S составляют в 10 мМ гистидине, pH 6, 70 мМ аргинина HCl и 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 и инкубируют при 45°C с различными концентрациями сахарозы и пролина для оценки стабильности белка. Составы также инкубируют при -20°C и подвергают циклам замораживания/размораживания (замораживание -30°C ; размораживание при комнатной температуре) для сравнения стабильности при хранении в замороженном виде, которая необходима для поддержания хранения нерасфасованного составленного лекарственного вещества. Полисорбат 80 включают в эти составы, чтобы сделать их более типовыми составами конечного продукта. Вязкость при 20°C измеряют для всех образцов при $t=0$, и она суммирована в таблице 6 выше. Таблица 6 показывает, что замена сахарозы на пролин снижает вязкость в зависимости от концентрации, указывая на то, что составы с пролином могут быть

полезными для конечного продукта, если нет отрицательного влияния на стабильность.

H4N1276S продемонстрировал умеренно улучшенную стабильность при составлении с сахарозой по сравнению с пролином и инкубировании при 45°C в течение 21 дня (таблица 9, показанная на фигуре 8). Общее относительное изменение от t=0 для образования HMW частиц для составления с 5% сахарозой составляет 2,7%, тогда как полное относительное изменение от t=0 для HMW частиц для 2% композиции пролина составляет 3,3%. Это различие не считается значимым. Различия в общем относительном изменении от t=0 для вариантов, отличающихся зарядами, считаются находящимися в пределах вариабельности анализа для разных составов, которые были оценены.

Не наблюдается значимых изменений в любом признаке качества для всех составов, содержащих сахарозу и/или пролин, при инкубации при -20°C или подвергают 8 циклам замораживания/размораживания (-30°C замораживание; размораживание при комнатной температуре) (таблицы 7 и 8, показано на фигурах 6 и 7). Таким образом, пролинсодержащий состав проявляет более низкую вязкость и сравнимую стабильность по сравнению с содержащим сахарозу составом при хранении в условиях ускоренного или стрессового хранения. На основании этих результатов выбирают два ведущих состава: 1) 150 мг/мл H4N1276S, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 70 мМ аргинина HCl, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 и 5% (масса/объем) сахарозы; и 2) 150 мг/мл H4N1276S, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 70 мМ аргинина HCl, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 и 3% (масса/объем) пролина. Концентрацию пролина немного увеличивают для обеспечения адекватной стабильности белка в типовых условиях длительного хранения.

Пример 8: Выбор состава

Долговременную стабильность исследуют для сравнения профилей стабильности для двух ведущих составов (см. пример 7 выше). Данные о стабильности при -30°C собирают для оценки длительного хранения нерасфасованной составленной лекарственной субстанции (таблица 10, показанная на фигуре 9). Данные по стабильности при 5°C собирают для оценки долгосрочного хранения лекарственного продукта (таблица 11, как показано на фигуре 10). Данные показывают, что эквивалентные профили стабильности получены для обоих ведущих составов.

Взаимосвязь между вязкостью, концентрацией белка и температурой используют для облегчения выбора состава, который будет доставляться в диапазоне концентраций белка и температур. Рассматривают влияние концентрации белка на вязкость конечного состава и то, как эксципиенты влияют на эту взаимосвязь. Подобным образом температуру рассматривают с целью а) отмены и/или введения лекарственного средства (примерно комнатная температура); б) стадий производства нерасфасованной продукции (обычно примерно 15-25°C); и в) хранения.

Чтобы направлять выбор конечного состава и лучше охарактеризовать влияние термостабилизаторов на вязкость, составы готовят с разными концентрациями H4N1276S в двух ведущих составах (10 мМ гистидин, pH 6,0, 70 мМ аргинин HCl, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 и 5% (масса/объем) сахарозы и 10 мМ гистидина, pH 6, 70

мМ аргинина HCl, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 и 3% (масса/объем) пролина). Вязкость измеряют при температуре от 5°C до 35°C. Фигура 11 иллюстрирует зависимость вязкости от концентрации H4N1276S для обоих составов при 20°C. Состав, содержащий пролин (нижняя кривая на фиг. 11), имеет стабильно более низкие вязкости при нескольких концентрациях H4N1276S по сравнению с составом, содержащим сахарозу (верхняя кривая на фигуре 11).

Эта тенденция была еще более очевидной при более низких температурах (фигуры 12А и 12В). Данные показывают, что состав, содержащий 3% (масса/объем) пролина (фигура 12В), предлагает более широкий рабочий диапазон значений вязкости, которые считаются приемлемыми. Поскольку стабильность двух основных композиций эквивалентна, и состав, содержащий пролин, имеет благоприятный профиль вязкости, состав, содержащий 3% (масса/объем) пролина, выбирают для конечного состава лекарственного препарата.

Конечный жидкий лекарственный состав H4N1276S содержит 150 мг/мл H4N1276S, 10 мМ гистидина, 70 мМ аргинина HCl, 3% (масса/объем) пролина и 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 при pH 6,0. Основными путями деградации, идентифицированными во время разработки, являются высокомолекулярные виды и варианты, отличающиеся зарядами. Конечная осмоляльность состава составляет приблизительно 480 мОсм/кг, и вязкость составляет приблизительно 15 сПуаз (20°C), что подходит для клинического применения.

Составы H4N1276S, разработанные для доклинического (токсикология GLP) и клинического применения, представлены в таблице 12 ниже.

Таблица 12: Композиция H4N1276S составов, используемых в исследованиях токсикологии GLP и H4N1276S клинических DP составов

Компонент состава	Замороженная жидкость (использование токсикологии GLP)	Лиофилизированный DP (клиническое использование)		Жидкий DP (клиническое использование) для ВВ или ПК введения
		Восстановлен для ВВ введения	Восстановлен для ПК введения	
H4N1276S	50 мг/мл	50 мг/мл	100 мг/мл	150 мг/мл
Гистидин	10 мМ	10 мМ	20 мМ	10 мМ
Аргинин HCl	Неприменим	Неприменим	Неприменим	70 мМ
Сахароза	5% (масса/объем)	5% (масса/объем)	10% (масса/объем)	Неприменим
Пролин	Неприменим	Неприменим	Неприменим	3% (масса/объем)
Полисорбат	0,1%	0,1%	0,2%	0,1%

Компонент состава	Замороженная жидкость (использование токсикологии GLP)	Лиофилизированный DP (клиническое использование)		Жидкий DP (клиническое использование) для ВВ или ПК введения
		Восстановлен для ВВ введения	Восстановлен для ПК введения	
80	(масса/объем)	(масса/объем)	(масса/объем)	(масса/объем)
pH	6	6	6	6

Пример 9: Сводка исследований стабильности Н4Н1276S лекарственного продукта

Проведены исследования для оценки хранения и повышенной стабильности Н4Н1276S 150 мг/мл лекарственного продукта (DP) (данные не показаны). Стабильность оценивают по цвету и внешнему виду, мутности (увеличение OD при 405 нм), pH, твердым частицам по MFI, % общего белка, восстановленного RP-UPLC (ультраэффективной жидкостной хроматографией с обращенной фазой), % чистоты по не восстановленному и восстановленному MCE-SDS (капиллярный электрофорез - додецилсульфат натрия на микрочипе), % чистоты по данным по SE-UPLC (эксклюзионная ультраэффективная жидкостная хроматография), анализ вариантов, отличающихся зарядами, по CEX-UPLC (катионообменная ультраэффективная жидкостная хроматография), анализ вариантов, отличающихся зарядами, по iCIEF (динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование) и % относительная эффективности по данным биоанализа.

DP, использованный для исследования хранения и ускоренной стабильности, готовят путем инкубации 5,0 мл составленного лекарственного вещества (FDS) в 20 мл прозрачном стеклянном флаконе типа 1. Н4Н1276S DP физически и химически стабилен при хранении при 5°C в течение не менее 12 месяцев. Никаких заметных изменений физической или химической стабильности ни в одном из отслеживаемых признаков не обнаружено.

Инкубацию проводят либо при 25°C/60% относительной влажности (повышенная стабильность), либо при 45°C (стрессовая стабильность). Эти ускоренные и стрессовые условия выбирают для выяснения путей разложения Н4Н1276S. Что касается ускоренных исследований стабильности, то через 3 месяца при 25°C/60% ОВ обнаруживают заметное образование НМВ частиц и вариантов, отличающихся зарядами. После инкубации в течение 1 месяца при 25°C/60% ОВ не наблюдается заметное образование НМВ частиц или вариантов, отличающихся зарядами, что указывает на то, что Н4Н1276S DP можно подвергать воздействию комнатной температуры в течение коротких периодов времени. Н4Н1276S сохраняет активность по данным биоанализа после инкубации в ускоренных условиях.

Инкубация при 45°C приводит к значительному образованию НМВ частиц и вариантов, отличающихся зарядами, всего за 7 дней, демонстрируя, что увеличение НМВ

частиц и образование вариантов, отличающихся зарядами, являются основными путями деградации H4N1276S DP. H4N1276S DP оказался физически и химически стабильным при перемешивании (встряхивании при температуре окружающей среды) в течение 120 минут или при проведении 8 циклов замораживания/размораживания (замораживание при -30°C и размораживание при комнатной температуре). Не было обнаружено заметных изменений физической или химической стабильности ни по одному из отслеживаемых признаков.

Результаты исследований ускоренного хранения DP и исследований стрессовой стабильности показывают, что H4N1276S 150 мг/мл DP является стабильным во время производства и хранения. Кроме того, H4N1276S состав может выдерживать кратковременное воздействие комнатной температуры без ущерба для физической или химической стабильности. H4N1276S 150 мг/мл DP, предпочтительно, хранят при 2°C - 8°C , при этом воздействие температур, превышающих 2°C - 8°C ограничено

Пример 10: Разработка высококонцентрированного жидкого лекарственного продукта на основе аминокислоты для H4N1276S, от скрининга эксципиента до характеристики реологических свойств

H4N1276S лиофилизируют, и затем восстанавливают до более высоких концентраций белка растворами, содержащими желаемые эксципиенты. Предварительно лиофилизированный состав содержит 4 мл 87,5 мг/мл H4N1276S, с 10 мМ гистидина, pH 6 и 2,5% (масса/объем) сахарозы. Лиофилизированная лепешка содержит 350 мг твердого H4N1276S. Лиофилизированную лепешку восстанавливают 2-2,4 мл раствора с получением конечной концентрации H4N1276S 160-175 мг/мл (номинальная). Раствор для восстановления доводят так, чтобы конечный образец содержал 20 мМ гистидина, pH 6, с 5% (масса/объем) сахарозы и тестируемый эксципиент. Для корректировки pH от 6 до 5, к раствору для восстановления добавляют ацетатный буфер так, чтобы конечная концентрация ацетата составляла 40 мМ.

Чтобы исследовать стабильность при ускоренном и замороженном хранении H4N1276S составов, содержащих эксципиенты, снижающие вязкость, вязкость тестируемых составов измеряют при 20°C с помощью вискозиметра Rheosense. Тестируемые составы инкубируют в стеклянных флаконах объемом 2 мл при следующих условиях: (i) 45°C в течение 0, 7, 14 и 21 дня; (ii) -20°C в течение 0, 1, 2, 3, 6 и 9 месяцев; и (iii) 5°C , -30°C и -80°C в течение 0 и 3 месяцев. Полученный продукт анализируют на содержание агрегатов с помощью SEC, и на образование варианта, отличающегося зарядом, с помощью CEX.

Чтобы понять взаимосвязь между концентрацией белка, температурой и вязкостью для H4N1276S составов с пониженной вязкостью, готовят H4N1276S составы с концентрацией 200 мг/мл, содержащие следующие комбинации эксципиентов. Все составы содержат 10 мМ гистидина при pH 6 с 0,1% (масса/объем) полисорбатом 80:

- 5% (масса/объем) сахарозы
- 5% (масса/объем) сахарозы, 70 мМ L-Arg HCl

- 3% (масса/объем) сахарозы, 1,3% (масса/объем) пролина, 70 мМ L-Arg HCl
- 3% (масса/объем) пролина
- 3% (масса/объем) пролина, 70 мМ L-Arg HCl.

Состав с концентрацией 200 мг/мл разбавляют соответствующим буфером для состава до концентраций белка 50-200 мг/мл. Измерения вязкости каждого состава проводят на вискозиметре Rheosense при температурах от 5 до 35°C. Наконец, анализ данных проводят в GraphPad Prism и MiniTab.

Результаты скрининга эксципиентов, снижающих вязкость, показаны на фигурах 13А и 13В. На фигуре 13А после восстановления базовый состав содержит 175 мг/мл H4N1276S, 20 мМ гистидина, рН 6, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80, 5% (масса/объем) сахарозы. Для получения раствора с рН 5 добавляют ацетат до конечной концентрации 40 мМ. Эквивалентный состав, содержащий 40 мМ ацетата, рН 6,0, имеет вязкость 64,1 сПуаз, что указывает на то, что как добавление ацетата, так и доведение рН до 5,0 снижают вязкость H4N1276S составов. На фигуре 13В при восстановлении, базовый состав содержит 165 мг/мл H4N1276S, 20 мМ гистидина/40 мМ ацетата, рН 5,0, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80 и 5% (масса/объем) сахарозы.

Добавление одновалентных и двухвалентных солей (L-Arg HCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂, Ca(OAc)₂, Mg(OAc)₂) снижает вязкость H4N1276S составов. Вязкость H4N1276S составов также снижают путем корректировки рН с 6 до 5. Наконец, сахароза увеличивает вязкость, в то время как L-пролин не влияет на вязкость H4N1276S состава.

Образование высокомолекулярных (НМВ) частиц через 21 день инкубации при 45°C показано на фигуре 14. Выбранные H4N1276S составы, содержащие различные VR (снижающие вязкость) эксципиенты, инкубируют при 45°C и анализируют с помощью SEC на содержание агрегатов. Относительное увеличение НМВ частиц в образце t=0 наносят на график в зависимости от состава. В ускоренных условиях (45°C в течение 21 дня) наблюдают следующее:

- L-Arg HCl мало влияет на образование НМВ частиц;
- Снижение рН H4N1276S составов приводит к повышенному образованию НМВ частиц;
- Относительное увеличение НМВ частиц аналогично для составов, содержащих CaCl₂ и MgCl₂, по сравнению с составами, содержащими L-Arg HCl и NaCl;
- L-пролин действует как термостабилизатор и снижает образование НМВ частиц;

и

- По сравнению с составом L-Arg HCl, составы, содержащие Ca(OAc)₂ и Mg(OAc)₂, имеют пониженное образование НМВ частиц.

Таким образом, L-Arg HCl или Mg(OAc)₂ (значительное снижение вязкости) в буфере с рН 6 (улучшенная ускоренная стабильность) выбирают в качестве ведущих понизителей вязкости для дальнейшей разработки.

Стабильность H4N1276S составов, содержащих вспомогательные вещества, снижающие вязкость, суммирована на фигурах 15А и 15В. 150 мг/мл H4N1276S составы,

содержащие либо 70 мМ L-Arg HCl, либо 25 мМ Mg(OAc)₂, были составлены с различными концентрациями сахарозы и/или L-пролина. Концентрации были скорректированы так, чтобы достичь осмоляльности приблизительно 300 мМ для поддержания изотоничности. Составы, содержащие только L-Arg HCl или Mg(OAc)₂, получают при 175 мг/мл H4N1276S. Для фигуры 15А, показывающей разложение H4N1276S через 21 дня инкубации при 45°C, образцы инкубируют при 45°C и анализируют с помощью SEC на содержание агрегатов и CEX на образование кислотного варианта, отличающегося зарядом. Относительное увеличение HMW или кислых частиц из образца t=0 нанесено на график в зависимости от состава. Для фигуры 15В, показывающей стабильность при хранении в замороженном виде H4N1276S, образцы инкубируют при -20°C в течение 9 месяцев и анализируют с помощью SEC для определения содержания агрегатов. Долю HMW видов наносят на график как функцию от времени. Тестируемые составы также инкубируют при -80°C, -30°C и 5°C в течение 3 месяцев (данные не показаны). Никаких изменений HMW частиц не наблюдают при -80°C ни для одного из составов. При 5°C или -30°C составы без термостабилизатора имеют повышенное содержание HMW частиц.

Составы Mg(OAc)₂ были немного менее стабильными в условиях ускоренного хранения, чем составы, содержащие L-Arg HCl, с повышенным образованием как HMW частиц, так и кислых частиц. Замена сахарозы на L-пролин снижает вязкость в зависимости от концентрации. Добавление сахарозы, L-пролина или комбинации обоих наполнителей в достаточной степени защищает H4N1276S от образования HMW частиц при -20°C. Таким образом, 70 мМ L-Arg HCl выбирают в качестве основного редуктора вязкости для дальнейшей разработки. Представленные данные подтверждают использование Mg(OAc)₂ в качестве резервного эксципиента.

Взаимосвязь между концентрацией белка, температурой и вязкостью показана на фигурах 16А и 16В. На этих фигурах показаны контурные графики вязкости к концентрации белка и температуре. Контурные графики созданы в Minitab. Формы в точках, соответствующих 150 мг/мл и 165 мг/мл (или 150 мг/мл+10%) H4N1276S, находятся при рекомендуемой температуре хранения 5°C (кружок) или рекомендуемой температуре введения 25°C (звездочка).

Взаимосвязь между вязкостью и концентрацией белка при 20°C показана на фигуре 17. Вязкость наносят как функцию от концентрации белка, и данные подгоняют к экспоненциальной кривой с использованием GraphPad Prism. Уравнения могут применяться для прогнозирования вязкости на основе известной концентрации, что полезно для определения производственных спецификаций в конечном продукте и информирования при разработке процесса. Уравнение для состава, содержащего 3% L-пролин и 70 мМ L-Arg HCl, следующее: $\text{вязкость} = 0,444 e^{0,023[\text{H4N1276S}]}$.

Вышеупомянутые контурные графики и график подтверждают следующие наблюдения:

По сравнению с композициями, содержащими сахарозу, композиции, содержащие

L-пролин, имеют сопоставимо более низкую вязкость при нескольких концентрациях H4N1276S (и температурах; данные не показаны) с или без 70 мМ L-Arg HCl.

Кривая зависимости вязкости от концентрации белка (при 20°C) для состава, содержащего комбинацию 5% сахарозы и 3% L-пролина, очень похожа на состав 3% пролина. Фактически, различие между этими двумя составами было более очевидным при более низких температурах и более высоких концентрациях белка. Контурные графики для этих составов имеют тонкие, но отчетливые различия (данные не показаны).

При рассмотрении как температуры, так и производственных характеристик, состав с L-пролином предлагает более широкий рабочий диапазон значений вязкости, которые считаются приемлемыми для подкожного введения (фигура 16А).

Состав на основе аминокислот, содержащий 150 мг/мл H4N1276S, 10 мМ гистидина, pH 6 с 70 мМ L-Arg HCl и 3% пролина, выбирают для разработки H4N1276S DP.

Композиция, содержащая комбинацию и сахарозы и L-пролина, исключают из дальнейшей разработки, поскольку она не дает преимуществ с точки зрения стабильности при хранении в замороженном состоянии (см. выше).

Таким образом, в настоящем документе было найдено полное понимание взаимосвязи между вязкостью, концентрацией белка и температурой, чтобы осуществлять принятие решений и облегчить выбор состава, который будет стабильным при хранении и может быть доставлен в формате предварительно заполненного шприца или автоматического шприца. Вязкость в идеале следует рассматривать в диапазоне концентраций белка, и целевую концентрацию следует выбирать на нижнем конце кривой зависимости вязкости от концентрации белка, чтобы учесть производственные характеристики DP и стадий производства, связанных с процессом (*m.e.*, нерасфасованным лекарственным веществом).

Пример 11: Совместимость с устройством для внутривенной доставки

Для доставки в клинических условиях, 150 мг/мл H4N1276S DP разводят в пакете для внутривенного (ВВ) введения изотонического раствора для ВВ введения в клинических дозах 5 мг/кг и 15 мг/кг. Оценивают стабильность H4N1276S при ВВ введении клинических доз. Две концентрации примесей, 0,5 мг/мл H4N1276S и 20 мг/мл H4N1276S, исследуют в попытке ограничить низкие и высокие концентрации добавок, которые можно вводить в клинических условиях.

Для оценки доставки смеси из пакетов для ВВ введения с использованием ВВ насоса и инфузионного набора, содержащего встроенный фильтр, тестируют пакеты для ВВ введения, содержащие изотонический раствор, сделанные из поливинилхлорида (PVC) с ди-(2-этилгексил)фталатом (DEHP) и два типа широко используемых инфузионных насосов (перистальтический и жидкостный). Также оценивают несколько инфузионных наборов, содержащих основные материалы (PVC с DEHP, PVC с TOTM и полиэтилен) и встроенный 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона.

Анализы

Совместимость смеси Н4Н1276S с материалами, используемыми во ВВ дозирующем устройстве, оценивают с помощью следующих анализов:

- Цвет и внешний вид при визуальном осмотре
- рН
- Мутность измеряют по увеличению оптической плотности (OD) при 405 нм.
- Анализ частиц, невидимых невооруженным глазом, в смеси путем светоблокировки (НАС)
- Концентрация белка с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-UPLC)
- Чистота с помощью SE-UPLC
- Эффективность, с помощью биоанализа: относительная эффективность каждого образца определяют с помощью биоанализа и определяют как: $(IC_{50} \text{ эталонного образца} / IC_{50} \text{ образца}) \times 100\%$. Измеренная эффективность стабильности образцов при хранении должна составлять в пределах 50-150% от измеренной активности эталонного стандарта.

Процедура исследования

100 мл ВВ пакеты с изотоническим раствором, содержащие Н4Н1276S DP, подвергают различным стрессовым условиям, чтобы оценить, является ли Н4Н1276S стабильным в смеси и при внутривенном введении. ВВ пакеты, содержащие смесь, первоначально выдерживают в течение 24 часов при 5°C; затем пакеты инкубируют не менее 8 часов при 25°C. После завершения этих инкубаций, каждый из оцениваемых инфузионных наборов подсоединяют к ВВ пакету, примиряют смесью и выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем каждую смесь прокачивают через соответствующий набор для инфузии со скоростью 25 мл/час или 500 мл/час. В клинике, дозы могут быть введены с использованием DP, разведенного в 100 или 250 мл ВВ пакетах. Для исследования совместимости используют 100 мл ВВ пакеты для тестирования каждой дозы.

Результаты исследования

0,5 мг/мл и 20 мг/мл Н4Н1276S, разведенные в изотоническом растворе, физически и химически стабильны во всех тестируемых условиях, включая следующие условия: i) 5°C в течение 24 часов во ВВ пакете, ii) 25°C в течение 8 часов во ВВ пакете, и iii) температура окружающей среды в течение одного часа во всех тестируемых инфузионных наборах.

Кроме того, смеси Н4Н1276S являются стабильными при прокачивании через каждый из оцениваемых инфузионных наборов с использованием различных инфузионных насосов со скоростью 25 мл/час и 500 мл/час. Осадок не обнаруживается при визуальном осмотре или измерении мутности. рН растворов является стабильным, заметного снижения концентрации белка не наблюдается. В этом исследовании совместимости не наблюдается заметных изменений в относительной доле частиц с высокой или низкой молекулярной массой, по данным эксклюзионной

ультразвук-эффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC). Никаких значимых изменений в уровнях частиц, не видимых невооруженным глазом, по сравнению с $t=0$, не наблюдают после прокачивания образцов через инфузионные наборы со скоростью 500 мл/час, по данным анализа НІАС. Наконец, все протестированные образцы сохраняют активность, по данным биоанализа.

Полученные данные подтверждают возможность приготовления и введения следующих доз в клинике:

- ВВ пакеты с изотоническим раствором, сделанные из PVC с DEHP, совместимы с Н4Н1276S для ВВ введения.

- Н4Н1276S может быть разведен до концентраций всего 0,5 мг/мл во ВВ пакетах из ПВХ, содержащих изотонический раствор для ВВ введения;

- Н4Н1276S может быть разведен до 20,0 мг/мл во ВВ мешках из ПВХ, содержащих изотонический раствор для ВВ введения;

- Смесь Н4Н1276S в изотоническом растворе стабильна после инкубации во ВВ пакете из ПВХ в течение до 24 часов при 5°C и 8 часов при 25°C. Разведенную смесь Н4Н1276S вводят в течение четырех часов после приготовления;

- Смесь Н4Н1276S в изотоническом растворе может быть введена с применением стандартного инфузионного насоса;

- Смесь Н4Н1276S может быть введена с помощью инфузионного набора, состоящего из PVC, содержащего DEHP, PVC, содержащего TOTM, или полиэтилена;

- Смесь Н4Н1276S совместима с использованием встроенного 0,2 мкм полиэфирсульфонового фильтра;

- Смесь Н4Н1276S может быть введена со скоростью потока от 25 до 500 мл/час.

Пример 12: Дальнейшие исследования стабильности лекарственного продукта Н4Н1276S

Состав Н4Н1276S подвергают длительному хранению при -20°C и 5°C в течение периодов до 36 месяцев и анализируют стабильность.

Сначала, состав содержит 150 мг/мл Н4Н1276S, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 70 мМ аргинина HCl, 3% (масса/объем) пролина и 0,1% (масса/объем) полисорбата 80. Объем заполнения 2,0 мл в 5 мл гамма-облученном поликарбонатном флаконе Nalge-Nunc с крышкой, покрытой силиконом.

Таблица 13: Исследование стабильности Н4Н1276S составленного лекарственного вещества, хранящегося при -20°C

Анализ	Срок хранения при -20°C (месяцы)									
	0	1	3	6	9	12	18	24	36	
Цвет и внешний вид	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о
Мутность (увеличение OD)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	

при 405 нм)										
рН		6,0	6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,1	6,0
% Общего белка, восстановленного RP- UPLC		100	103	102	103	102	105	102	106	107
Чистота по MCE- SDS	Не восстановленн ый; % основного пика	95,1	НЗ	НЗ	94,5	НЗ	94,9	НЗ	НЗ	96,5
	Восстановленн ый; % тяжелая+легкая цепь	97,8	НЗ	НЗ	91,8	НЗ	99,4	НЗ	НЗ	99,1
Чистота по SE- UPLC	% HMW	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4
	% Мономера	98,8	98,8	98,7	98,7	98,6	98,7	98,6	98,6	98,6
	% LMW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Анализ варианто в, отличаю щихся зарядами , по CEX- UPLC	% Кислых	28,5	29,1	28,8	29,8	30,1	29,9	29,1	29,5	29,1
	% Главных	47,3	46,8	48,1	46,5	48,4	49,8	48,9	46,8	46,5
	% Основных	24,2	24,2	23,1	23,7	21,6	20,3	22,1	23,7	24,5
Анализ варианто в, отличаю щихся зарядами , по	% Кислых	37,9	НЗ	НЗ	38,3	НЗ	38,4	НЗ	37,0	36,1
	% Главных	50,2	НЗ	НЗ	49,8	НЗ	49,1	НЗ	50,0	52,0
	% Основных	11,9	НЗ	НЗ	11,9	НЗ	12,5	НЗ	13,0	11,9

iCIEF									
-------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Затем, состав содержит 150 мг/мл H4H1276S лекарственного продукта, 10 mM L-гистидина, pH 6,0, 70 mM аргинина HCl, 3% (масса/объем) L-пролина и 0,1% (масса/объема) полисорбата 80. Заполняемый объем 5,0 мл в 20 мл прозрачных стеклянных флаконах типа 1 с 20 мм пробками West S2-451 4432/50 GRV B2-40 с покрытием FluroTec®.

Таблица 14: Исследование стабильности H4H1276S лекарственного продукта, хранящегося при 5°C

Анализ		Срок хранения при 5°C (месяцы)							
		0	1	3	6	9	12	18	24
Цвет и внешний вид		Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о	Про йден о
Мутность (увеличение OD при 405 нм)		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,0	6,0	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,0
Анализ частиц с помощью MFI (частицы/мл)	2-10 мкм	131	H3	H3	1406	H3	1104	H3	888
	≥10 мкм	0	H3	H3	19	H3	15	H3	6
	≥25 мкм	0	H3	H3	0	H3	2	H3	0
Общее содержание белка по RP-UPLC (мг/мл)		158,2	159,1	157,5	158,3	152,3	161,9	152,2	159,1
Чистота по MCE-SDS	He восстановленный; % основного пика	92,2	H3	H3	95,2	H3	94,9	H3	95,0
	Восстановленный; % тяжелая+легкая цепь	98,2	H3	H3	99,6	H3	97,6	H3	98,3
Чистота по SE-UPLC	% HMW	1,4	1,3	1,4	1,5	1,5	1,6	1,6	1,7
	% основных	98,6	98,6	98,6	98,5	98,4	98,4	98,3	98,2
	% LMW	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Анализ	% область 1	29,1	28,2	29,2	29,8	30,5	30,5	30,3	29,6

вариантов, отличающи хся зарядами, по СЕХ- UPLC	% область 2	47,1	46,6	46,7	48,0	50,5	48,5	46,4	45,8
	% область 3	23,8	25,2	24,0	22,3	19,0	21,0	23,3	24,6
Анализ вариантов, отличающи хся зарядами, по iCIEF	% область 1	36,4	НЗ	НЗ	38,5	НЗ	38,8	НЗ	37,0
	% область 2	50,4	НЗ	НЗ	49,0	НЗ	47,8	НЗ	50,5
	% область 3	13,2	НЗ	НЗ	12,5	НЗ	13,4	НЗ	12,5
% Относительной эффективности (биоанализ)		90	НЗ	НЗ	97	НЗ	109	НЗ	106

Составленное лекарственное вещество хранят в течение длительных периодов времени (до 36 месяцев) при -20°C , и лекарственный продукт хранят в течение длительных периодов времени (до 24 месяцев) при 5°C . Как видно из таблиц 13 и 14, составленный Н4Н1276S показал стабильность, *например*, значения остаются в приемлемых диапазонах во всех тестах, во всем диапазоне продолжительности хранения.

Пример 13: Контейнеры

Первичным контейнером для лекарственного продукта антитела, предназначенный для клинической разработки и коммерциализации продукта, является предварительно заполненный шприц, который представлен либо в виде отдельного шприца для самовведения, либо встроен в автоматический шприц для самовведения. Составы антител также могут быть разработаны в стеклянных флаконах (для доставки внутривенной инфузией).

Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными в настоящем документе конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий фармацевтический состав, содержащий: (а) антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 человека (ANGPTL3); (b) буфер; (c) органический соразтворитель; и (d) по меньшей мере, один модификатор вязкости, где состав имеет pH $6,0 \pm 0,3$.
2. Жидкий фармацевтический состав по п.1, где состав дополнительно содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту.
3. Фармацевтический состав по п.1 или 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащихся в вариательной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащиеся в вариательной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.
4. Фармацевтический состав по любому из пп.1-3, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариательную область тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 66 и вариательную область легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 74.
5. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-4, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 с SEQ ID NO: 68/70/72/76/78/80.
6. Фармацевтический состав по любому из пп.1-5, где концентрация антител составляет от $5 \text{ мг/мл} \pm 0,75 \text{ мг/мл}$ до $250 \text{ мг/мл} \pm 37,5 \text{ мг/мл}$.
7. Фармацевтический состав по любому из пп.1-6, где концентрация антитела составляет $150 \pm 22,5 \text{ мг/мл}$.
8. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-7, где концентрация антитела составляет $175 \text{ мг/мл} \pm 26,25 \text{ мг/мл}$.
9. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-8, где буфером является гистидин.
10. Фармацевтическая композиция по п.9, где концентрация гистидина составляет от $5 \text{ mM} + 1 \text{ mM}$ до $20 \text{ mM} + 4 \text{ mM}$.
11. Фармацевтический состав по п.9 или 10, где концентрация гистидина составляет примерно $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$.
12. Фармацевтический состав по любому из пп.1-11, где органическим соразтворителем является полисорбат.
13. Фармацевтический состав по п.12, где концентрация полисорбата составляет от $0,01\% \text{ масса/объем} \pm 0,005\%$ до $0,5\% \text{ масса/объем} \pm 0,25\%$.
14. Фармацевтический состав по п.12 или 13, где концентрация полисорбата составляет $0,1\% \text{ масса/объем} \pm 0,05\%$.
15. Фармацевтический состав по любому из пп. 12-14, где органическим соразтворителем является полисорбат 80.
16. Фармацевтический состав по любому из пп.1-15, где, по меньшей мере, один

модификатор вязкости выбран из группы, состоящей из аргинина HCl, хлорида натрия, гистидина HCl, ацетата натрия, хлорида кальция, хлорида магния, ацетата кальция и ацетата магния.

17. Фармацевтический состав по п.16, в котором, по меньшей мере, один модификатором вязкости является аргинин HCl.

18. Фармацевтический состав по п.17, где концентрация аргинина HCl составляет от примерно 50 мМ до примерно 75 мМ.

19. Фармацевтический состав по п.17 или 18, где концентрация аргинина HCl составляет примерно 70 мМ.

20. Фармацевтический состав по любому из пп.2-19, где аминокислотой является пролин.

21. Фармацевтический состав по п.20, где концентрация пролина составляет от 0 до $5\% \pm 1\%$.

22. Фармацевтический состав по п.20 или 21, где концентрация пролина составляет $3\% \pm 0,6\%$.

23. Жидкий фармацевтический состав, содержащий: i) 150 мг/мл+22,25 мг/мл анти-ANGPT3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; ii) от 5 мМ+1 мМ до 20 мМ+4 мМ гистидина; iii) от 0,1% масса/объем+0,05% до 0,5% масса/объем+0,25% полисорбата 80; iv) от 50 мМ до 75 мМ аргинина HCl; и v) от 1% + 0,2% до 5% + 1% масса/объем пролина, при pH 6,0+0,3.

24. Жидкий фармацевтический состав по п.23, где концентрация гистидина составляет 10 мМ+2 мМ, где концентрация полисорбата составляет 0,1% масса/объем+0,05%, где концентрация аргинина-HCl составляет примерно 70 мМ, и где концентрация пролина составляет 3% масса/объем+0,6% масса/объем.

25. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-24, где композиция имеет вязкость менее примерно 20 сПуаз.

26. Фармацевтический состав по любому из пп.1-25, где, по меньшей мере, примерно 95% антител имеют нативную конформацию через 21 день при 45°C.

27. Фармацевтический состав по любому из пп.1-26, где, по меньшей мере, приблизительно 45% антител являются вариантом антитела с основным зарядом через 21 день при 45°C.

28. Фармацевтический состав по любому из пп.1-27, где, по меньшей мере, примерно 98% антител имеют нативную конформацию через 36 месяцев при 5°C.

29. Фармацевтический состав по любому из пп.1-28, где, по меньшей мере, примерно 55% антител являются вариантом антитела с основным зарядом через 36 месяцев при 5°C.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-29, где, по меньшей мере, приблизительно 98% антител имеют нативную конформацию через 36 месяцев при -30°C.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-30, где, по меньшей мере, приблизительно 57% антител являются вариантом антитела с основным зарядом через 36

месяцев при -30°C.

32. Фармацевтический состав по любому из пп. 23-31, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

33. Фармацевтический состав по любому из пп.23-32, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 66, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 74.

34. Фармацевтический состав по любому из пп.23-33, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 с SEQ ID NO: 68/70/72/76/78/80.

35. Фармацевтический состав по любому из пп.1-34, где состав находится в предварительно заполненном шприце или автоматическом шприце.

36. Фармацевтический состав по любому из пп.1-34, где состав находится в стеклянном флаконе.

37. Набор, содержащий фармацевтический состав по любому из пп.1-34, контейнер и инструкции.

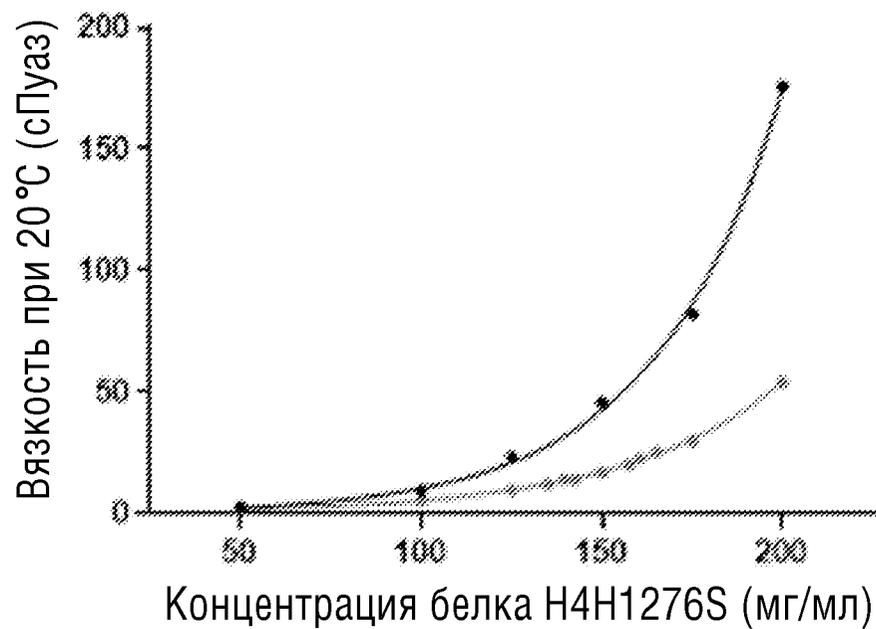
38. Набор по п.37, где контейнером является предварительно заполненный шприц или автоматический шприц.

39. Способ лечения, профилактики или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного с активностью ANGPTL3 или опосредованного ANGPTL3, у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтического состава по любому из пп. 1-36.

40. Способ по п.39, где фармацевтический состав вводят субъекту подкожно.

По доверенности

ФИГ.1



—●— 10 мМ гистидина, 5% сахарозы, 0,1% полисорбата 80, рН6

---■--- 10 мМ гистидина, 70 мМ аргинина-НСI, 5% сахарозы, 0,1% полисорбата 80, рН6

ФИГ.2

Таблица 2:

Состав		150 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, 75 мМ аргинина-HCl								
Объем заполнения		0.4 мл								
Контейнер/пробка		2 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®								
рН/Термо-стабилизатор (% масса/объем)	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^a	Мутность (повышение OD при 405 нм)	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^b			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по CEX-UPLC ^b		
					% HMW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5,5/5% Сахарозы	L12-673	Пройдено	0.03	100	7.6	-7.4	-0.2	10.7	-12.2	1.5
5,8/5% Сахарозы	L12-674	Пройдено	0.01	101	4.3	-4.2	-0.2	14.3	-16.1	1.8
6,0/5% Сахарозы	L12-675	Пройдено	0.03	102	3.7	-3.5	-0.2	16.4	-16.6	0.2
6,2/5% Сахарозы	L12-676	Пройдено	0.02	104	3.6	-3.4	-0.2	24.9	-24.5	-0.4
6,5/5% Сахарозы	L12-677	Пройдено	0.02	100	3.9	-3.7	-0.2	31.3	-26.0	-5.3
5,5/2% Пролина	L12-678	Пройдено	0.04	99	10.6	-10.5	-0.2	11.5	-12.9	1.4
5,8/2% Пролина	L12-679	Пройдено	0.02	100	5.8	-5.6	-0.2	14.4	-13.2	-1.2
6,0/2% Пролина	L12-680	Пройдено	0.01	101	4.8	-4.7	-0.2	17.4	-16.5	-0.8
6,2/2% Пролина	L12-681	Пройдено	0.02	104	3.9	-3.7	-0.2	26.8	-26.0	-0.8
6,5/2% Пролина	L12-682	Пройдено	0.02	106	4.0	-3.7	-0.3	31.0	-29.1	-1.9

2/20

ФИГ.3

Таблица 3:

Состав		150 мг/мл H4H1276S, 10 mM гистидина, 70 mM аргинина-HCl, pH 6,0										
Объем заполнения		2 мл										
Контейнер/пробка		5 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®										
% мас./об. сахарозы или пролина	% масса/объем полисорбата 80	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^a	Мутность (повышение OD при 405 нм)	pH	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^b			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по GEX-UPLC ^b		
							% HMW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5% Сахарозы	0%	L12-908	Пройдено	0.02	6.0	95	4.8	-4.8	0.0	0.4	0.3	-0.7
	0.02%	L12-909	Пройдено	0.00	6.0	103	1.7	-1.7	0.0	0.0	-0.5	0.5
	0.05%	L12-910	Пройдено	0.00	6.0	99	0.1	-0.1	0.0	0.4	0.4	-0.9
	0.1%	L12-911	Пройдено	0.00	6.0	99	0.0	0.0	0.0	-0.6	0.2	0.4
2% Сахарозы/ 1,3% Пропина	0%	L12-912	Пройдено	0.02	6.0	97	6.3	-6.3	0.0	-0.3	3.8	-3.5
	0.02%	L12-913	Пройдено	0.01	6.0	98	1.8	-1.7	0.0	0.4	-0.4	0.0
	0.05%	L12-914	Пройдено	0.00	6.0	97	0.1	-0.1	0.0	0.4	0.1	-0.4
	0.1%	L12-915	Пройдено	0.01	6.0	98	0.0	0.0	0.0	0.4	-0.1	-0.3
2% Пропина	0%	L12-916	Пройдено	0.00	6.0	98	4.8	-4.8	0.0	-0.6	1.7	-1.1
	0.02%	L12-917	Пройдено	0.00	6.0	97	1.2	-1.2	0.0	0.0	1.0	-1.0
	0.05%	L12-918	Пройдено	0.01	6.0	94	0.1	-0.1	0.0	-0.3	-0.6	0.9
	0.1%	L12-919	Пройдено	0.01	6.0	100	0.0	0.0	0.0	-0.1	1.6	-1.5

ФИГ.4

Таблица 4:

Состав		150 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, 70 мМ аргинина-HCl, pH 6,0										
Объем заполнения		1,5 мл										
Контейнер/пробка		5 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®										
% мас./об. сахарозы или пролина	% масса/объем полисорбата 80	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^a	Мутность (повышение OD при 405 нм)	pH	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^b			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по CEX-UPLC ^b		
							% HMW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5% Сахарозы	0%	L12-908	Пройдено	0.03	6.0	96	3.1	-3.6	0.5	17.9	-22.2	4.3
	0.02%	L12-909	Пройдено	0.02	6.0	98	3.2	-3.7	0.5	15.3	-18.0	2.6
	0.05%	L12-910	Пройдено	0.02	6.0	96	3.2	-3.8	0.6	18.2	-19.4	1.2
	0.1%	L12-911	Пройдено	0.01	6.0	98	3.2	-3.8	0.5	21.1	-24.2	3.1
2% Сахарозы/ 1,3% Пропина	0%	L12-912	Пройдено	0.03	6.0	97	3.5	-4.1	0.6	18.8	-17.8	-1.0
	0.02%	L12-913	Пройдено	0.03	6.0	95	3.6	-4.2	0.6	15.4	-16.0	0.6
	0.05%	L12-914	Пройдено	0.02	6.0	93	3.7	-4.2	0.5	15.6	-17.5	1.9
	0.1%	L12-915	Пройдено	0.02	6.0	97	3.8	-4.4	0.6	17.5	-18.1	0.6
2% Пропина	0%	L12-916	Пройдено	0.03	6.0	97	3.8	-4.3	0.5	15.5	-16.5	1.0
	0.02%	L12-917	Пройдено	0.02	6.0	99	3.9	-4.4	0.5	18.0	-18.0	0.0
	0.05%	L12-918	Пройдено	0.03	6.0	93	4.0	-4.6	0.5	16.8	-18.9	2.1
	0.1%	L12-919	Пройдено	0.02	6.0	99	4.1	-4.6	0.5	16.5	-17.7	1.2

ФИГ.5

Таблица 5:

Состав		150 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, 70 мМ аргинина-HCl, pH 6,0						
Объем заполнения		2 мл (перемешивание), 1,5 мл (45 °C)						
Контейнер/пробка		5 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®						
% мас./об. сахарозы или пролина	% масса/объем полисорбата 80	FDG номер партии	Перемешивание встряхиванием в течение 120 минут			Инкубация при 45 в течение 28 дней		
			Анализ частиц по MFI ^a (# на мл)			Анализ частиц по MFI ^a (# на мл)		
			2-10 мкм	≥10 мкм	≥25 мкм	2-10 мкм	≥10 мкм	≥25 мкм
5% Сахарозы	0%	L12-908	137	6	2	624	295	30
	0.02%	L12-909	123	46	7	245	132	23
	0.05%	L12-910	190	114	17	72	22	2
	0.1%	L12-911	122	94	23	243	147	11
2% Сахарозы/ 1,3% Пропина	0%	L12-912	680	212	29	354	181	29
	0.02%	L12-913	Не применимо (ошибка сохранения данных)			200	116	13
	0.05%	L12-914	417	233	29	78	94	23
	0.1%	L12-915	256	81	5	136	43	2
2% Пропина	0%	L12-916	1672	268	26	27	4	0
	0.02%	L12-917	508	286	39	99	27	0
	0.05%	L12-918	594	144	18	656	511	92
	0.1%	L12-919	413	144	11	809	307	56

ФИГ.6

Таблица 7:

Состав		150 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 70 мМ аргинина-HCl, 0,1% полисорбата 80 или 175 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 70 мМ аргинина-HCl ^a									
Объем заполнения		0,4 мл									
Контейнер/пробка		2 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®									
Концентрация сахарозы/пролина (% мас./об.)	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^b	Мутность (повышение OD при 405 нм)	рН	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^c			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по CEX-UPLC ^c		
						% HMW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5%/0%	L12-741	Пройдено	0,00	6,1	102	0,1	-0,2	0,0	0,9	-0,7	-0,3
3%/1%	L12-742	Пройдено	0,01	6,1	100	0,1	-0,2	0,1	0,2	-0,6	0,4
2%/1,3%	L12-743	Пройдено	0,01	6,1	101	0,2	-0,2	0,1	0,6	-0,7	0,1
0%/2%	L12-744	Пройдено	0,00	6,1	99	0,3	-0,3	-0,1	0,3	-1,0	0,6
0%/0% ^a	L12-745	Пройдено	0,02	6,1	102	7,2	-7,2	0,0	0,4	-2,4	2,0

ФИГ.7

Таблица 8:

Состав		150 мг/мл Н4Н1276S, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 70 мМ аргинина-НСI, 0,1% полисорбата 80 или 175 мг/мл Н4Н1276S, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 70 мМ аргинина-НСI ^а									
Объем заполнения		0,4 мл									
Контейнер/пробка		2 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®									
Концентрация сахарозы/пролина (% мас./об.)	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^б	Мутность (повышение OD при 405 нм)	рН	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^с			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по CEХ-UPLC ^с		
						% НМW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5%/0%	L12-741	Пройдено	0.00	6.1	108	0.1	0.0	-0.1	0.6	-0.1	-0.6
3%/1%	L12-742	Пройдено	0.00	6.0	105	0.1	0.0	0.0	0.8	-0.5	-0.2
2%/1.3%	L12-743	Пройдено	0.01	6.0	105	0.1	0.0	0.0	0.6	-0.6	0.0
0%/2%	L12-744	Пройдено	0.00	6.0	104	0.1	-0.1	0.0	0.1	-0.3	0.2
0%/0% ^в	L12-745	Пройдено	0.00	6.0	108	0.6	-0.6	-0.1	0.0	0.1	-0.1

7/20

ФИГ.8

Таблица 9:

Состав		150 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 70 мМ аргинина-HCl, 0,1% полисорбата 80 или 175 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 70 мМ аргинина-HCl ^а									
Объем заполнения		0,4 мл									
Контейнер/пробка		2 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®									
Концентрация сахарозы/пролина (% мас./об.)	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^б	Мутность (повышение OD при 405 нм)	рН	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^с			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по CEX-UPLC ^с		
						% HMW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5%/0%	L12-741	Пройдено	0.01	6.1	103	2.7	-2.7	0.0	16.0	-17.2	1.2
3%/1%	L12-742	Пройдено	0.01	6.1	104	2.8	-2.8	0.0	16.7	-17.8	1.2
2%/1.3%	L12-743	Пройдено	0.02	6.1	99	2.9	-2.9	0.0	16.6	-18.0	1.4
0%/2%	L12-744	Пройдено	0.02	6.1	102	3.3	-3.3	0.0	16.5	-17.5	1.0
0%/0% ^в	L12-745	Пройдено	0.02	6.1	100	3.8	-3.8	0.0	15.0	-16.1	1.2

ФИГ.9

Таблица 10:

Состав		150 мг/мл H4H1276S, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 70 мМ аргинина-HCl, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80									
Объем заполнения		1 мл									
Контейнер/пробка		5 мл Nalge-Nunc гамма-облученный поликарбонатный флакон с пробкой, покрытой силиконом									
Концентрация сахарозы/пролина (% мас./об.)	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^a	Мутность (повышение OD при 405 нм)	pH	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^b			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по CEX-UPLC ^b		
						% HMW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5% Сахарозы	L12-967	Пройдено	0.00	6.0	105	0.0	0.1	0.0	-0.1	-2.7	2.8
3% Пролина	L12-969	Пройдено	0.01	6.0	106	0.1	-0.1	0.0	-1.1	-2.9	4.0

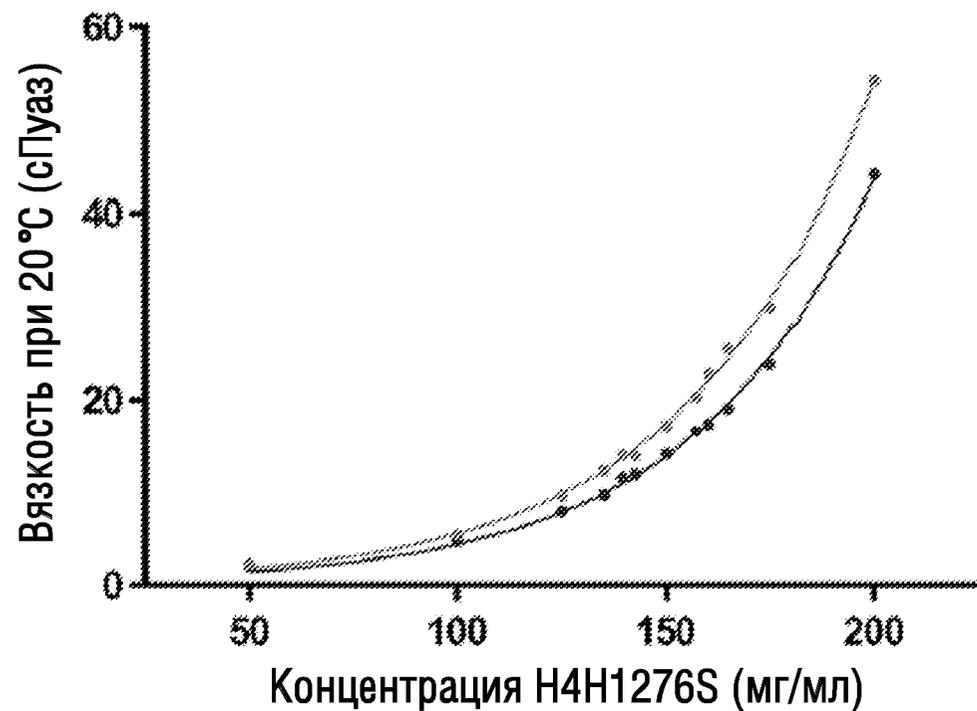
ФИГ.10

Таблица 11:

Состав		150 мг/мл Н4Н1276S, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 70 мМ аргинина-НСI, 0,1% (масса/объем) полисорбата 80									
Объем заполнения		1,1 мл									
Контейнер/пробка		2 мл типа 1 прозрачный стеклянный флакон с хлорбутиловой пробкой 4432/50, покрытой Fluro Tec®									
Концентрация сахарозы/пролина (% мас./об.)	FDG номер партии	Цвет и внешний вид ^а	Мутность (повышение OD при 405 нм)	рН	% белка, восстановленного RP-UPLC	Изменение чистоты по SE-UPLC ^б			Изменение вариантов, отличающихся зарядами, по CEX-UPLC ^б		
						% HMW	Мономер, %	% LMW	Кислые, %	Основные, %	Главные, %
5% Сахарозы	L12-967	Пройдено	0.00	6.0	101	0.4	-0.5	0.1	1.9	-4.6	2.7
3% Пролина	L12-969	Пройдено	0.00	6.0	100	0.4	-0.5	0.1	2.2	-5.3	3.1
Анализ частиц по MFI (# на мл)											
		t=0				5°C 36 месяцев					
		2-10 мкм	≥10 мкм	≥25 мкм				2-10 мкм	≥10 мкм	≥25 мкм	
5% Сахарозы	L12-967	599	62	18				1173	71	7	
3% Пролина	L12-969	405	14	2				1203	71	4	

10/20

ФИГ.11

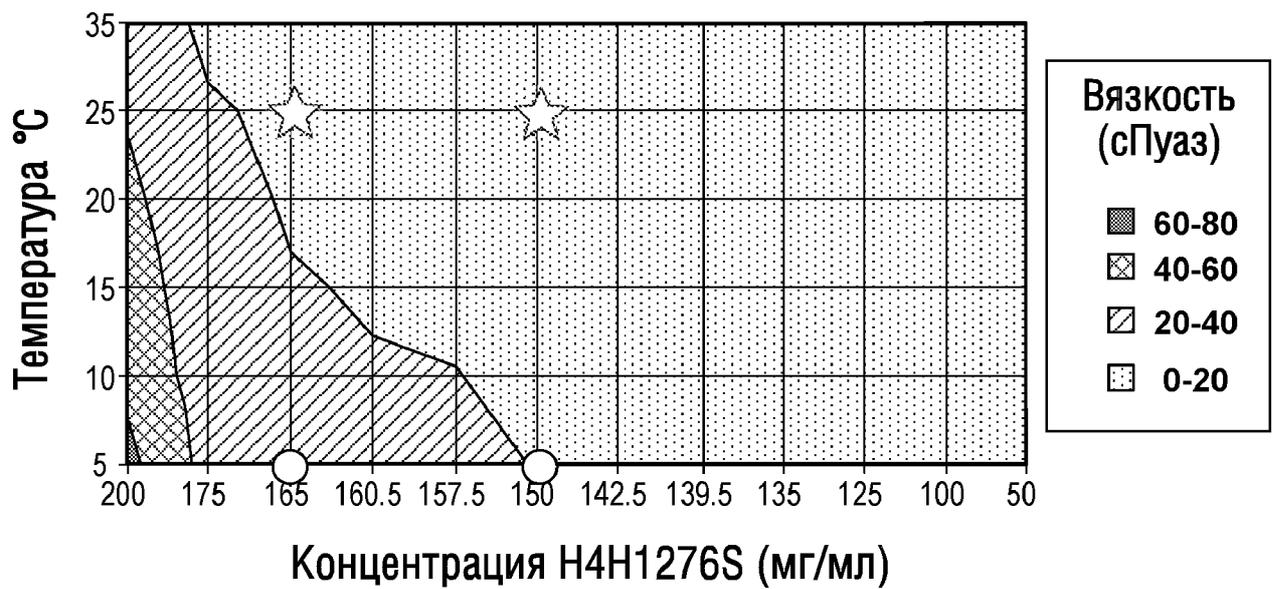


- 10 мМ гистидина, 70 мМ аргинина-НСl, 5% сахарозы, 0,1% полисорбата 80, рН6
- 10 мМ гистидина, 70 мМ аргинина-НСl, 3% сахарозы, 0,1% полисорбата 80, рН6

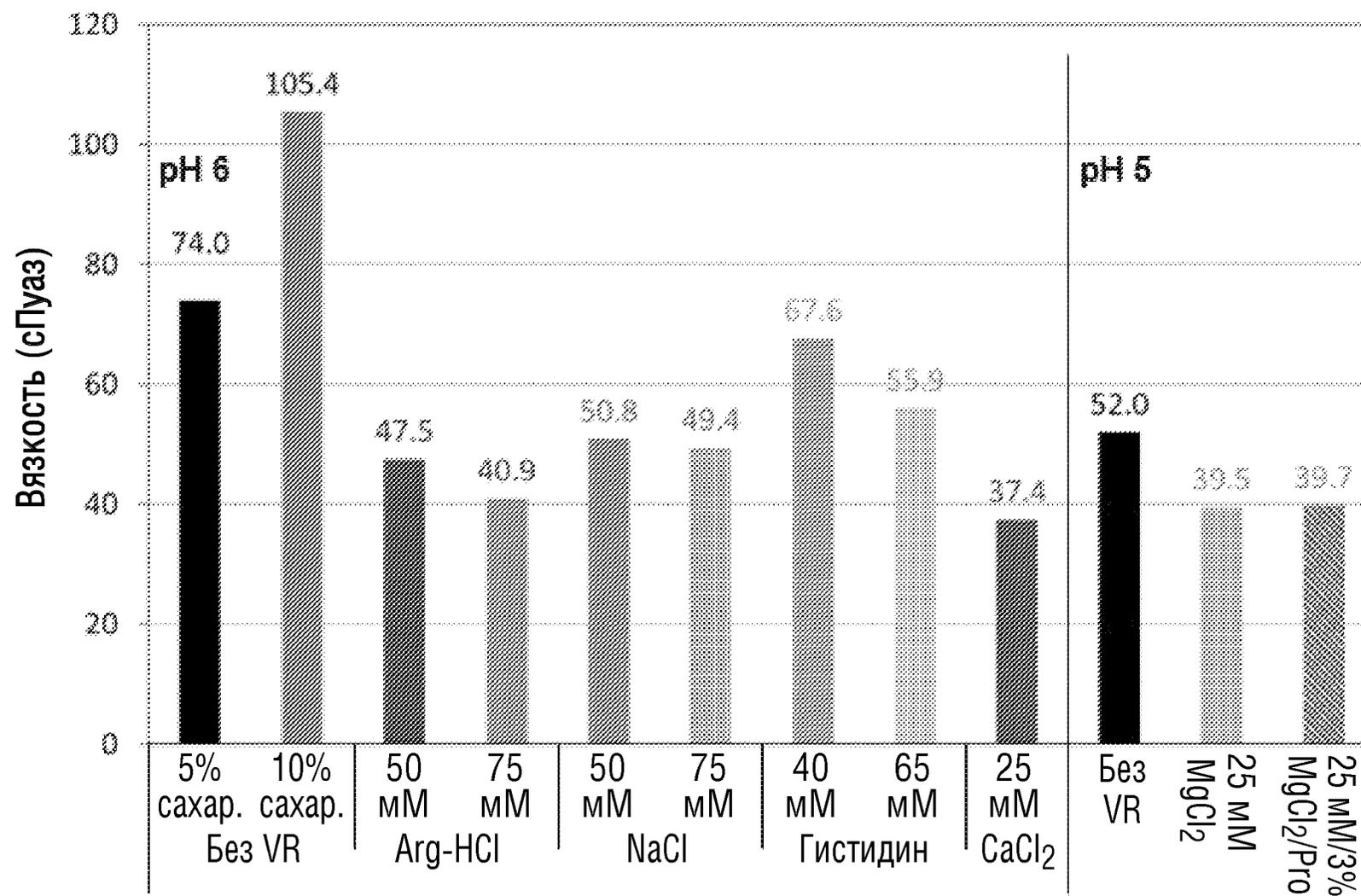
ФИГ.12А



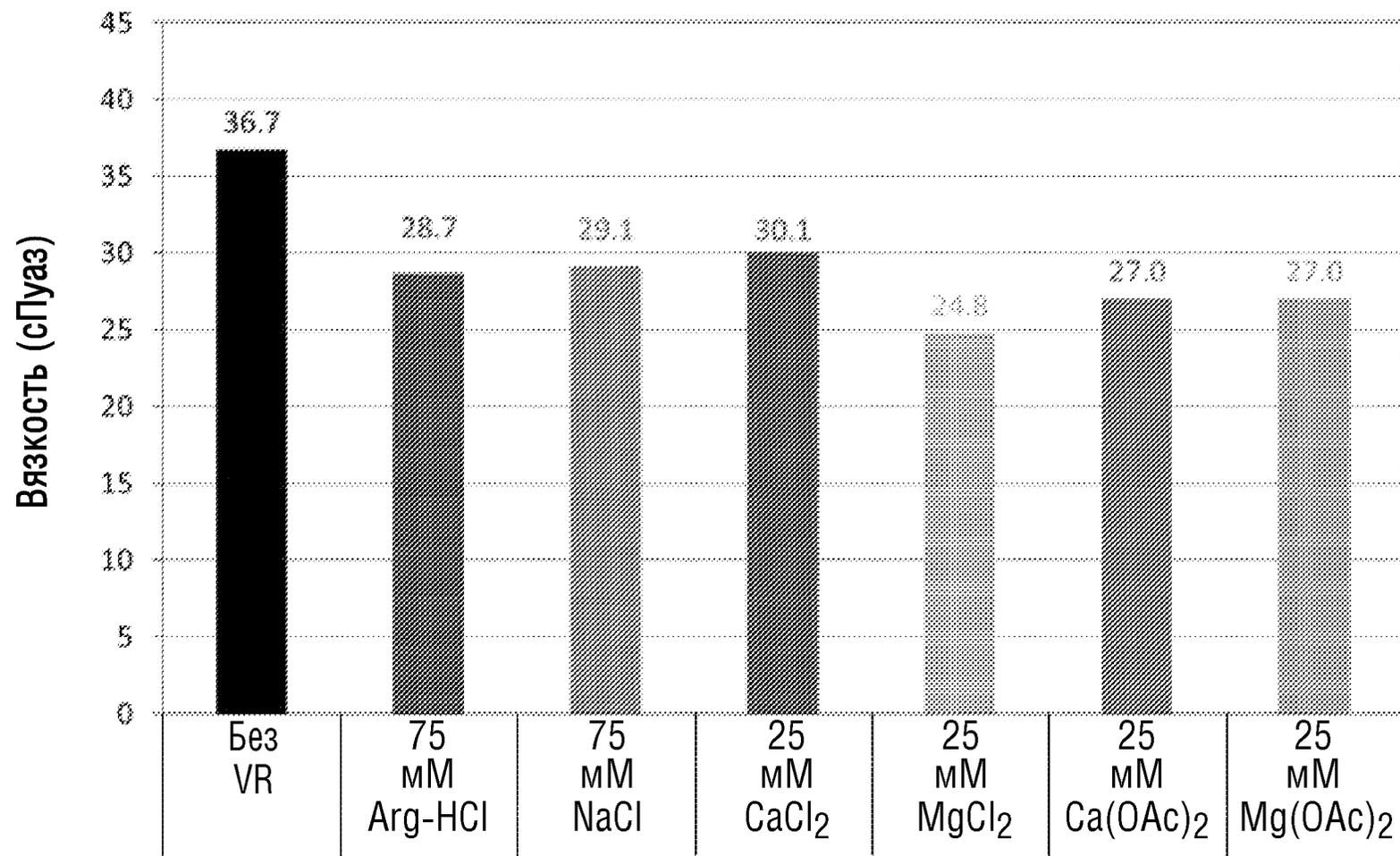
ФИГ.12В



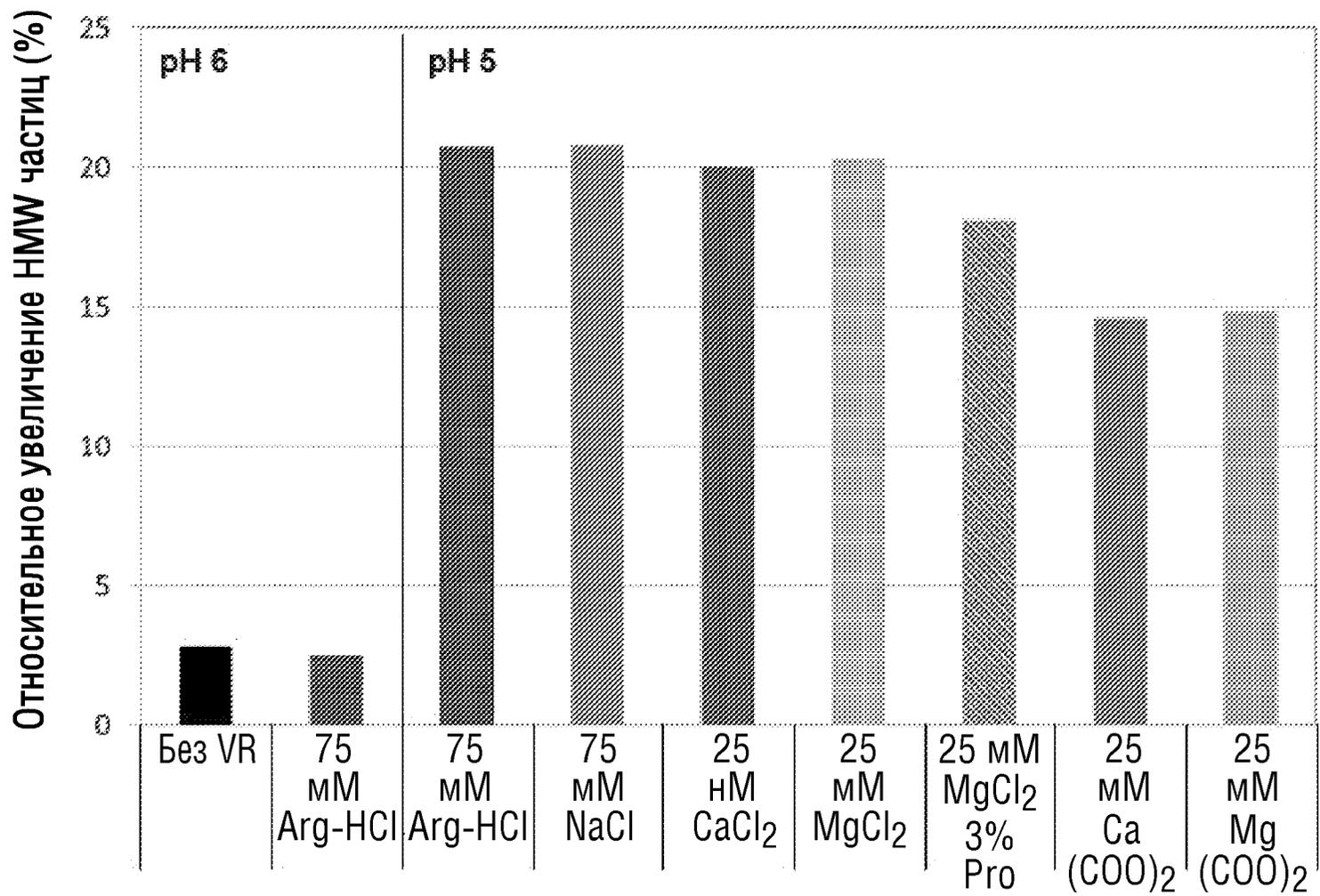
ФИГ.13А



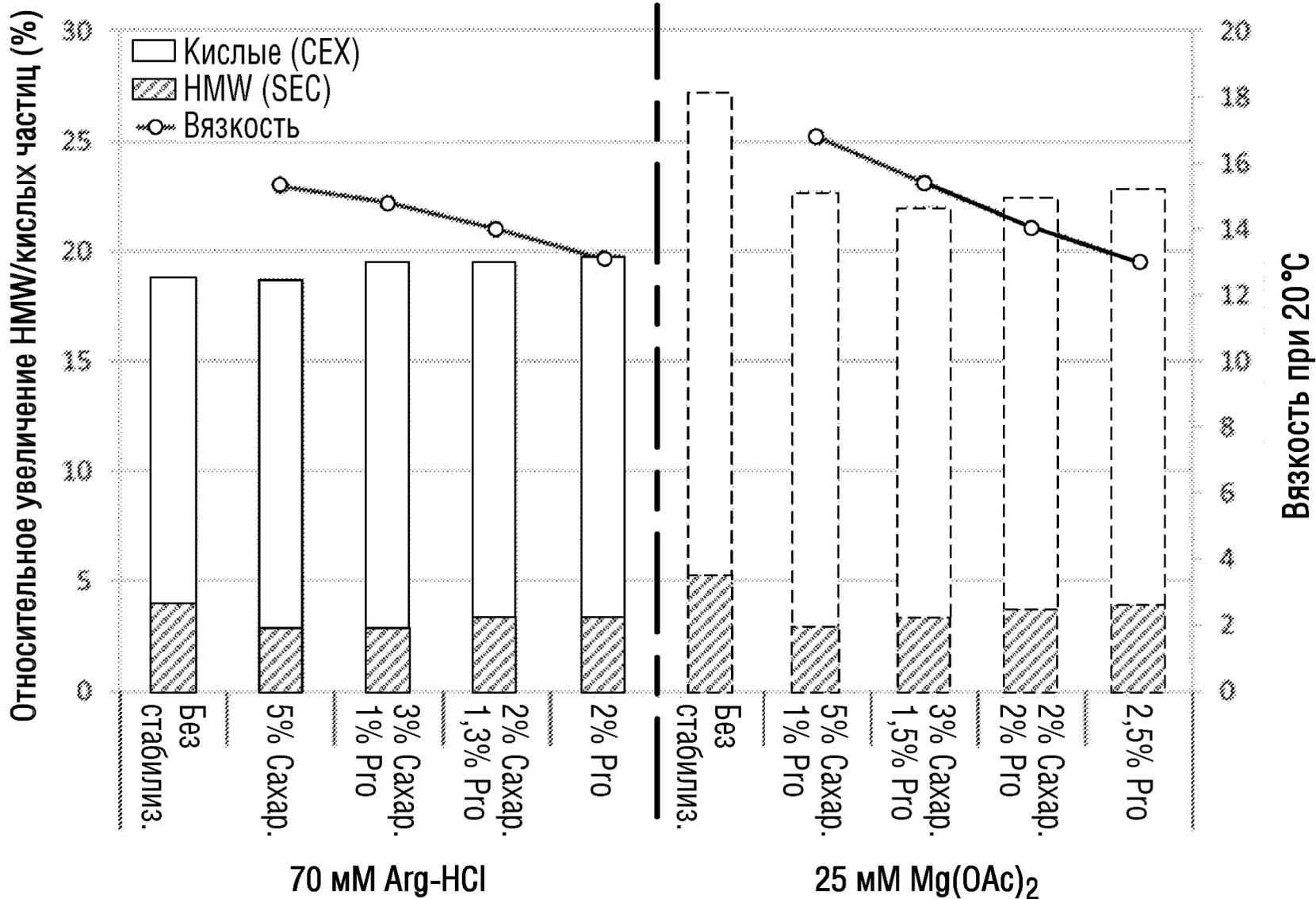
ФИГ.13В



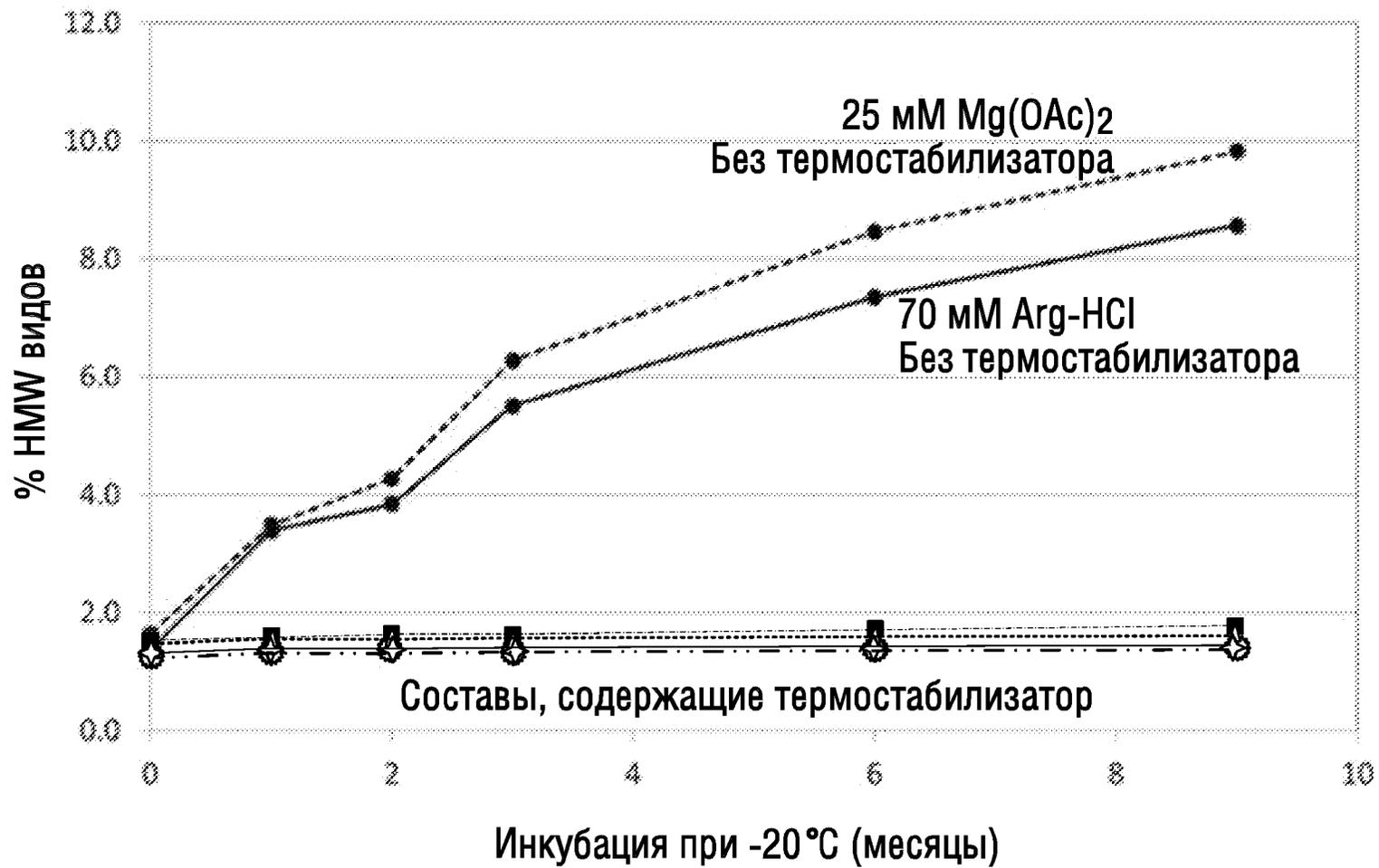
ФИГ.14



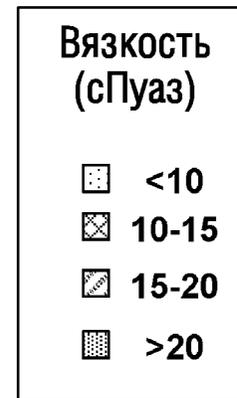
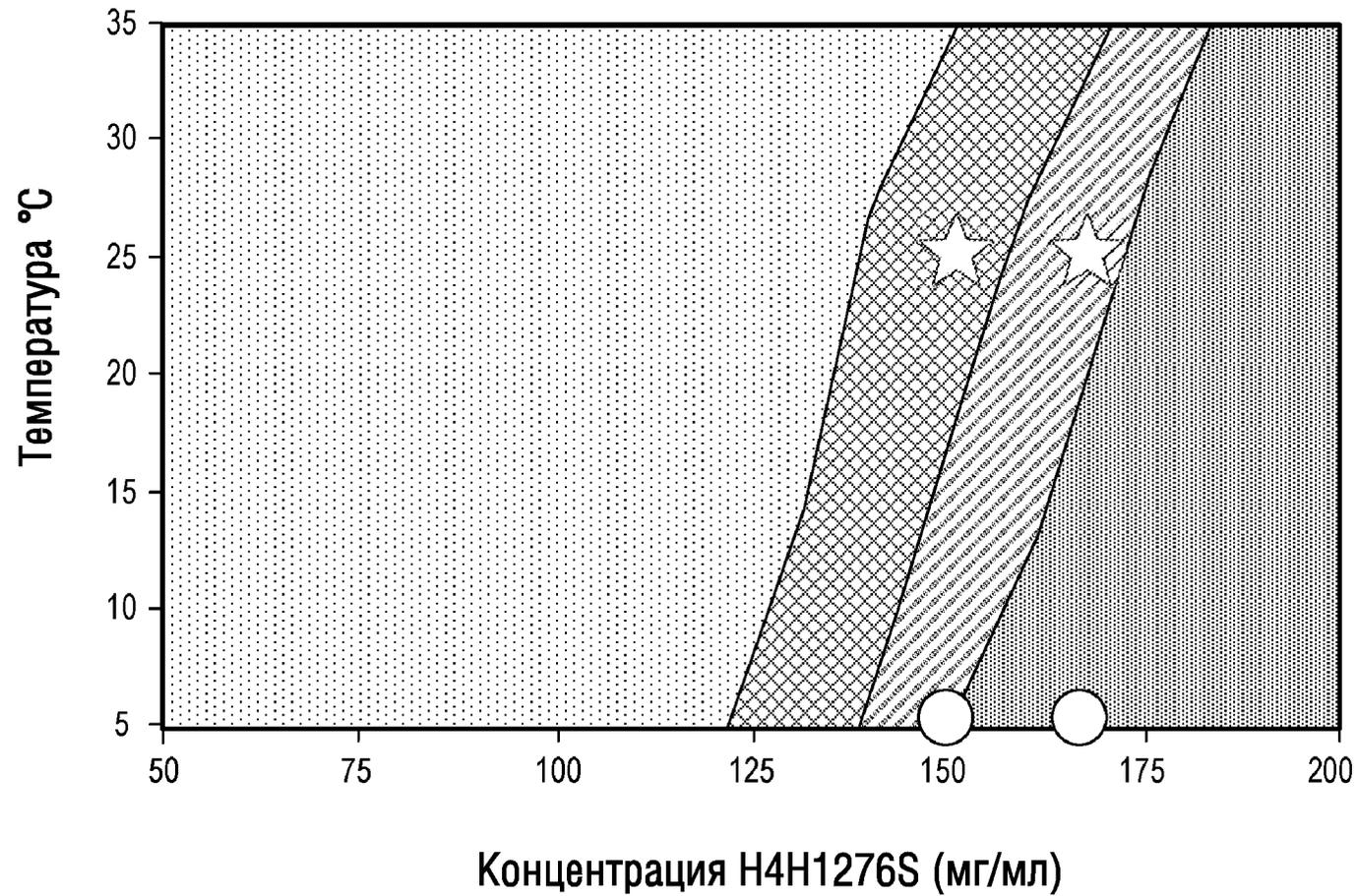
ФИГ.15А



ФИГ.15В

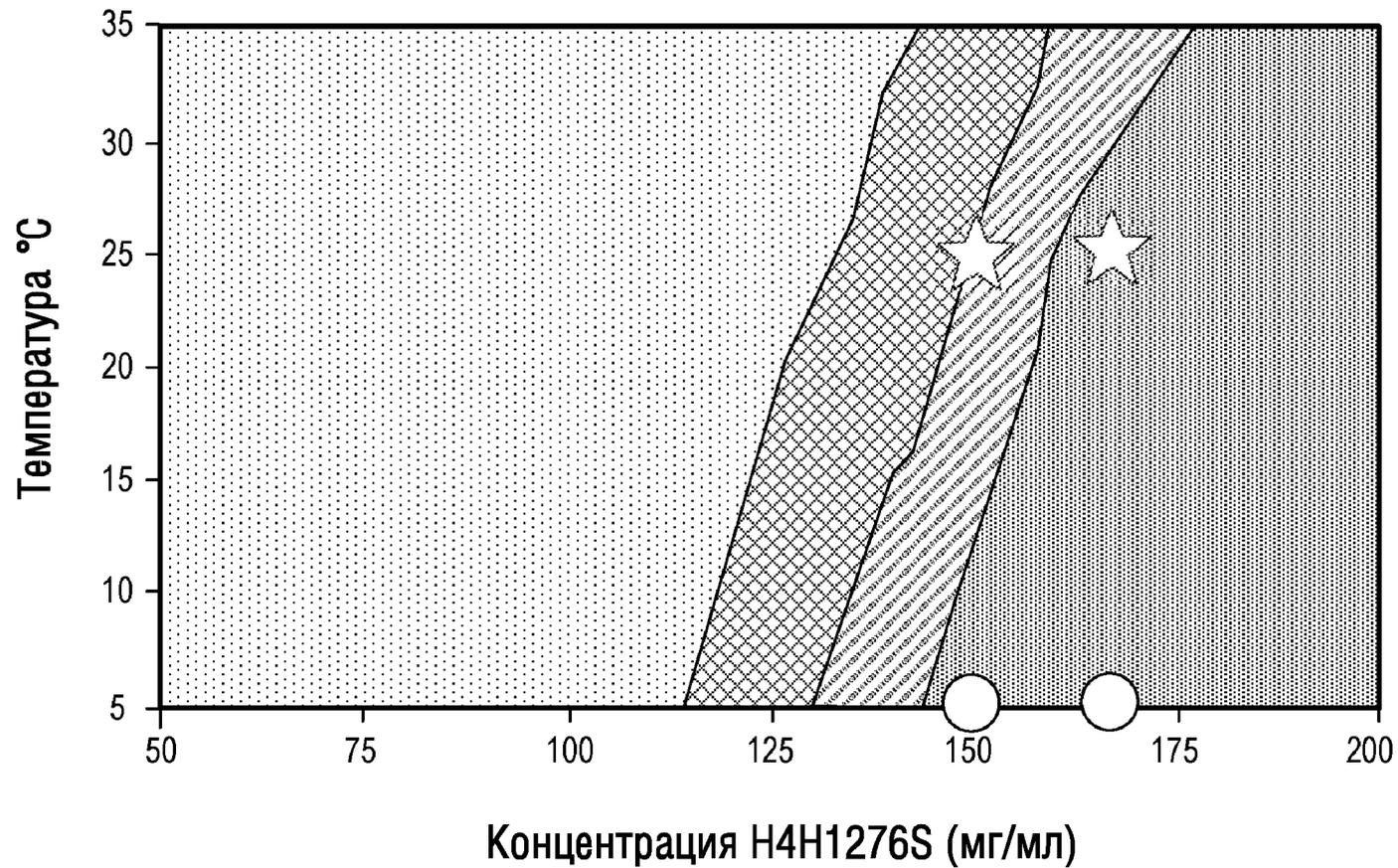


ФИГ.16А



18/20

ФИГ.16В



19/20

ФИГ.17

