

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291606** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.05

(22) Дата подачи заявки
2020.12.07

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(54) ЖИДКИЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ АНТИТЕЛО К IL-17

(31) 201911239277.9

(32) 2019.12.06

(33) CN

(86) PCT/CN2020/134170

(87) WO 2021/110164 2021.06.10

(71) Заявитель:
ЛИВЗОН МАБФАРМ ИНК. (CN)

(72) Изобретатель:
Лу И, Лэн Цзиньюй, Хэ Дэньхой, Хуан Хойюй (CN)

(74) Представитель:
Харин А.В., Галухина Д.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В. (RU)

(57) Предложен жидкий препарат, содержащий антитело к IL-17 (интерлейкин 17) в концентрации от 20 до 200 мг/мл, цитратный буфер в концентрации от 10 до 50 мМ, сахарозу в концентрации от 20 до 120 мг/мл или аргинин в концентрации от 50 до 250 мМ, и полисорбат 80 в концентрации от 0,1 до 5 мг/мл. Кроме того, жидкий препарат имеет pH 6,0±0,5, где антитело к IL-17 представляет собой моноклональное антитело к IL-17A/F. Жидкий препарат может представлять собой стабильный препарат для подкожной инъекции и может быть использован для лечения заболеваний, связанных с IL-17A и/или IL-17F, таких как псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка, остеоартрит или воспалительное заболевание кишечника.

A1

202291606

202291606

A1

ЖИДКИЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ АНТИТЕЛО К IL-17

Настоящая патентная заявка испрашивает приоритет патентной заявки Китая № CN201911239277.9, поданной 6 декабря 2019 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биофармацевтических препаратов, в частности, к стабильному жидкому фармацевтическому препарату, содержащему антитело к IL-17 (интерлейкин 17).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Известно, что лекарственные средства на основе моноклональных антител к IL-17 пригодны для лечения аутоиммунных заболеваний и воспалительных расстройств и т. п., таких как псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка, остеоартрит или воспалительное заболевание кишечника и т. п., и пациентов можно эффективно лечить с помощью подкожной инъекции моноклональных антител к IL-17.

Препараты моноклональных антител к IL-17, доступные в настоящее время на рынке, включают Cosentyx, противовоспалительный лекарственный препарат от Novartis, и Taltz, противовоспалительный лекарственный препарат от Eli Lilly, каждый из которых содержит моноклональное антитело к IL-17A (подтип IL-17) и состоит из гистиридиновой или цитратной буферной системы, неионогенного поверхностно-активного вещества полисорбата 80 и стабилизатора на основе сахарного спирта. Из анализа составов двух лекарственных препаратов можно сделать следующие выводы:

(1) Cosentyx: в настоящее время существует два типа продуктов: шприц-ручка или предварительно заполненная игла и лиофилизированный препарат. Препарат для шприц-ручки или предварительно заполненной иглы содержит метионин, который действует главным образом в качестве антиоксиданта. Предполагается, что молекула антитела содержит участки окисления, что является точкой риска, вызывающей нестабильность. Лيوфилизированный препарат имеет недостатки в виде высокой стоимости производства, сложного производственного процесса, трудоемких этапов применения и т. п., и его применение не так удобно по сравнению с жидким препаратом.

(2) Taltz: в препарате содержится высокая концентрация (11,69 мг/мл) NaCl, что выше, чем в изотоническом солевом растворе (9 мг/мл NaCl). Кроме того, цитратная

буферная система в препарате представляет собой 0,51 мг/мл безводной лимонной кислоты и 5,11 мг/мл дигидрата цитрата натрия (эквивалентно 20 мМ цитратного буфера). Осмотическое давление препарата должно быть близко к или более 400 мОсмоль/кг в соответствии с теоретическим расчетом. Гипертонический раствор при введении будет вызывать временное истощение эритроцитов и обезвоживание клеток крови и тканей, и, таким образом, с клинической точки зрения, обычно требуется, чтобы инъекция была как можно более изотоническим раствором. Таким образом, высокое осмотическое давление Taltz создает относительно большой риск и недостатки в его использовании. Кроме того, для однократного введения необходимы две дозы Taltz, поэтому Taltz неудобен для применения и его прием плохо соблюдается пациентами.

Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в новых жидких препаратах антител к IL-17, в частности, антител к IL-17A/F.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является обеспечение жидкого препарата, содержащего антитело к IL-17, который позволяет антителу стабильно присутствовать в относительно высокой концентрации и имеет как можно более низкую вязкость и осмотическое давление, близкое к изотоническому.

Настоящее изобретение обеспечивает следующие технические решения.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает жидкий препарат, содержащий антитело к IL-17 в концентрации от 20 до 200 мг/мл, цитратный буфер в концентрации от 10 до 50 мМ, сахарозу в концентрации от 20 до 120 мг/мл или аргинин в концентрации от 50 до 250 мМ, и полисорбат 80 в концентрации от 0,1 до 5 мг/мл, где указанный жидкий препарат имеет pH $6,0 \pm 0,5$.

Семейство IL-17 включает члены IL-17A, IL-17F, а также IL-17B, IL-17C, IL-17D и IL-17E. В жидком препарате, предложенном согласно настоящему изобретению, антитело к IL-17 представляет собой антитело к IL-17A/F. Что касается состава последовательностей, антитело к IL-17 по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и содержит в указанной переменной области тяжелой цепи CDR1 (область 1, определяющая комплементарность) (CDR1H), как показано в SEQ ID NO: 1, CDR2 (CDR2H), как показано в SEQ ID NO: 2, и CDR3 (CDR3H), как показано в SEQ ID NO: 3; и содержит переменную область легкой цепи (VL) и содержит в указанной переменной области легкой цепи CDR1 (CDR1L), как показано в SEQ ID NO: 4, CDR2 (CDR2L), как показано в SEQ ID NO: 5, и CDR3 (CDR3L), как показано в SEQ ID NO: 6.

Предпочтительно, антитело к IL-17 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 8.

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения антитело к IL-17 содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 10.

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения антитело к IL-17 представляет собой моноклональное антитело к IL-17A/F, содержащее две тяжелые цепи (HC), каждая из которых содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 9, и две легкие цепи (LC), каждая из которых содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 1 (CDR1H):

GYTFTDYNLN

SEQ ID NO: 2 (CDR2H):

VIHPDYGTTSYNQKFKD

SEQ ID NO: 3 (CDR3H):

YD YGDAMDY

SEQ ID NO: 4 (CDR1L):

RSSQSLV HSNNTYLH

SEQ ID NO: 5 (CDR2L):

KVSNRFS

SEQ ID NO: 6 (CDR3L):

SQSTHVP LT

SEQ ID NO: 7 (VH) :

QFQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNLNWVRQA PGKGLEWMGV
IHPDYGTTSY NQKFKDRVTM TVDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCVRYD
YGDAMDYWGQ GTLVTVSS

SEQ ID NO: 8 (VL) :

DIVMTQSPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLV HSNNTYLHW YLQKPGQPPQ
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSSQSTHVP
LTFGQGTKLE IK

SEQ ID NO: 9 (HC) :

QFQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNLNWVRQA PGKGLEWMGV
IHPDYGTTSY NQKFKDRVTM TVDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCVRYD
YGDAMDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10 (LC) :

DIVMTQSPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLHW YLQKPGQPPQ
 LLIYKVS~~NRF~~ SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQS~~THVP~~
LTFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения антитело к IL-17 согласно настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело, которое содержит последовательности, описанные выше, и состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, при этом тяжелая цепь антитела является такой, как показано в SEQ ID NO: 9, а легкая цепь антитела является такой, как показано в SEQ ID NO: 10. Последовательности и получение антитела раскрыты в публикации заявки PCT WO2018161340A1.

Предпочтительно, концентрация антитела к IL-17 составляет от 80 до 130 мг/мл, предпочтительно от 90 до 110 мг/мл и более предпочтительно составляет 100 мг/мл.

Предпочтительно, концентрация цитратного буфера составляет от 15 до 30 мМ, предпочтительно от 15 до 25 мМ и более предпочтительно составляет 20 мМ. Цитратный буфер получают из лимонной кислоты и дигидрата цитрата натрия, и предпочтительно он состоит из 0,66 мг/мл лимонной кислоты и 4,95 мг/мл дигидрата цитрата натрия.

Предпочтительно концентрация сахарозы составляет от 60 до 100 мг/мл, предпочтительно от 70 до 90 мг/мл и более предпочтительно составляет 80 мг/мл; в альтернативном варианте концентрация аргинина составляет от 80 до 200 мМ, предпочтительно от 100 до 170 мМ и более предпочтительно составляет 150 мМ.

Предпочтительно, концентрация полисорбата 80 составляет от 0,1 до 2,0 мг/мл и более предпочтительно составляет 0,5 мг/мл.

Предпочтительно, жидкий препарат имеет рН $6,0 \pm 0,3$, предпочтительно 6,0.

Предпочтительно жидкий препарат, предложенный в настоящем изобретении, не содержит антиоксиданта, такого как метионин; и не содержит понизителя вязкости в случае, когда жидкий препарат содержит сахарозу, и, в частности, жидкий препарат, предложенный в настоящем изобретении, не содержит хлорида натрия.

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения жидкий препарат, предложенный в настоящем документе, содержит антитело к IL-17 в концентрации 100 мг/мл, цитратный буфер в концентрации 20 мМ, сахарозу в концентрации 80 мг/мл и полисорбат 80 в концентрации 0,5 мг/мл; где указанный жидкий препарат имеет значение рН 6,0. В альтернативном варианте жидкий препарат, предложенный в настоящем документе, содержит антитело к IL-17 в концентрации 100 мг/мл, цитратный буфер в концентрации 20 мМ, аргинин в концентрации 150 мМ и полисорбат 80 в концентрации 0,5 мг/мл; где указанный жидкий препарат имеет рН 6,0.

Кроме того, в соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения жидкий препарат, предложенный в настоящем документе, состоит из ингредиентов, описанных выше, с регулируемым рН.

Жидкий препарат, предложенный в настоящем изобретении, может представлять собой фармацевтический препарат антитела к IL-17; и жидкий препарат может быть в форме раствора, эмульсии или суспензии, предпочтительно представляет собой раствор.

Предпочтительно жидкий препарат или жидкий фармацевтический препарат может представлять собой лекарственную форму для парентерального введения, которая может, например, включать лекарственные формы для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. Предпочтительно жидкий препарат согласно настоящему изобретению представляет собой препарат для инъекции, в частности, препарат для подкожной инъекции.

В контексте настоящего изобретения термин "препарат антитела" используется взаимозаменяемо с "жидким препаратом антитела".

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применение жидкого препарата при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с IL-17A и/или IL-17F.

Предпочтительно, заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки, остеоартрита и воспалительного

заболевания кишечника.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения заболевания, связанного с IL-17A и/или IL-17F, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества жидкого препарата, предложенного настоящим изобретением.

Предпочтительно, заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки, остеоартрита и воспалительного заболевания кишечника.

Предпочтительно, субъект является млекопитающим, таким как примат, более предпочтительно человеком.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предлагает контейнер или набор, содержащий его, причем контейнер содержит жидкий препарат, предложенный согласно настоящему изобретению.

Авторы настоящего изобретения успешно разработали новый жидкий препарат антитела, направленный на IL-17A и/или IL-17F человека. Жидкий препарат, предложенный в настоящем изобретении, содержит относительно высокую концентрацию антитела к IL-17A и/или IL-17F, в частности, моноклонального антитела к IL-17A/F, и при подкожном введении жидкий препарат может обеспечивать высокую дозу антитела, и однократная доза при введении жидкого препарата может удовлетворять потребность в введении, тем самым повышая эффективность лекарственного средства.

В частности, жидкий препарат, предложенный в настоящем изобретении, не содержит антиоксиданта или понизителя вязкости, но обеспечивает стабильность антитела в относительно высокой концентрации. Кроме того, сам препарат имеет низкую вязкость менее 10 сП и осмотическое давление, близкое к изотоническому, поэтому проблемы, вызванные введением гипертонических растворов, можно избежать, и можно достичь высокой комплаентности пациента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Варианты осуществления настоящего изобретения подробно описаны ниже со ссылкой на прилагаемые фигуры, на которых:

Фиг. 1 показывает результаты анализа внешнего вида и осмотра видимых примесей при скрининге pH препаратов антител в примере 1.

Фиг. 2 показывает результаты анализа скрининга ингредиентов препаратов антител в примере 3, где 2A: SEC-HPLC (эксклюзионная высокоэффективная жидкостная

хроматография), % агрегата, 2B: WCX-HPLC (слабая катионообменная HPLC), % главного пика, 2C: CE-SDS (капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия) (в невозстанавливающих условиях), % чистоты.

Фиг. 3 показывает теоретическое осмотическое давление и вязкость препаратов антител при различных концентрациях NaCl в примере 4.

Фиг. 4 показывает результаты анализа стабильности препаратов с NaCl и без него в примере 4, 4A: SEC-HPLC, % мономера, 4B: WCX-HPLC, % главного пика.

Фиг. 5 показывает результаты анализа совместимости препаратов антител с сывороткой в примере 5.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение проиллюстрировано ниже со ссылкой на конкретные примеры. Специалистам в данной области техники будет понятно, что данные примеры являются просто иллюстрацией настоящего изобретения и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Экспериментальные процедуры в следующих примерах являются общепринятыми, если не указано иное. Сырье и реагенты, используемые в следующих примерах, являются коммерчески доступными продуктами или могут быть получены в соответствии с общеизвестными способами в данной области техники, если не указано иное.

В следующих примерах использовали конкретное моноклональное антитело к IL-17A/F, в котором тяжелая цепь антитела является такой, как показано в SEQ ID NO: 9, а легкая цепь антитела является такой, как показано в SEQ ID NO: 10. Последовательности и получение антитела раскрыты в публикации заявки PCT WO2018161340A1, и указанное антитело упоминается в данном документе просто как "LZM012".

Жидкие препараты, содержащие антитело, получали согласно следующему способу: если исследуемый препарат содержал те же ингредиенты, что и исходный раствор LZM012, брали соответствующее количество исходного раствора LZM012, а затем регулировали pH раствора с помощью регулятора pH, например, соляной кислоты или гидроксида натрия, и непосредственно разбавляли концентрацию антитела до 100 мг/мл рецептурным буфером; и если исследуемый препарат содержал другие ингредиенты, чем исходный раствор LZM012, брали очищенный промежуточный продукт (полученный после UF/DF (ультрафильтрация/диафильтрация) и перед добавлением поверхностно-активного вещества), а затем заменяли эксципиенты в очищенном промежуточном продукте с помощью центрифугирования с ультрафильтрацией, затем

добавляли исходный раствор полисорбата 80 и, наконец, доводили концентрацию антитела до 100 мг/мл соответствующим рецептурным буфером. Полученный жидкий препарат стерильно фильтровали с использованием фильтра 0,22 мкм и по мере необходимости заполняли в контейнер в соответствии с объемом наполнения, который, в свою очередь, закрывали пробкой и закупоривали крышкой.

Общие способы, используемые в примерах, включают следующие.

DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия): пробоотборную ячейку замачивали 10% раствором Descon 90 при 80 °C в течение 30 минут, затем 2 раза промывали водой Milli-Q; и 2 раза промывали инжектор. Испытуемый образец разбавляли буфером LZM012 (ингредиенты: 20 mM цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80 с pH, соответствующим значению pH в условиях скрининга) до концентрации антитела 0,5 мг/мл и затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 2 минут. Перед сканированием образца выполняли несколько сканирований буфера для балансировки прибора. Температура сканирования находится в диапазоне 35-95 °C, а скорость сканирования составляет 90 °C/ч.

SEC-HPLC: выполняли в соответствии с Общим правилом 0512, том III, Фармакопея Китайской Народной Республики (издание 2015 г.). Использовали колонку TOSOH TSK G3000SWx1 (5 мкм, 7,8*300 мм) с 0,1 моль/л Na_2HPO_4 (pH 6,5) и 0,2 моль/л NaCl в качестве подвижной фазы; и длину волны детектирования устанавливали на 280 нм. Испытуемый образец разводили до концентрации антитела около 1 мг/мл для получения испытуемого раствора. 20 мкл раствора вводили в жидкостной хроматограф и рассчитывали относительное содержание мономера (регистрируемое значение), относительное содержание агрегатов (регистрируемое значение) и относительное содержание фрагмента (регистрируемое значение) методом нормализации площади.

WCX-HPLC: выполняли в соответствии с Общим правилом 0513, том III, Фармакопея Китайской Народной Республики (издание 2015 г.). Использовали колонку ProPac WCX-10 с раствором, содержащим 20 mM MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) и 20 mM NaCl в качестве подвижной фазы А, и раствором, содержащим 20 mM MES и 200 mM NaCl в качестве подвижной фазы В. Скорость потока составляет 1 мл/мин, температура колонки составляет 25 °C, а длину волны детектирования устанавливали на 280 нм; и проводили градиентное элюирование. Процент каждого главного пика, кислотного пика и основного пика рассчитывали как процент от площади пика.

CE-SDS (в невосстанавливающих условиях): в этой процедуре антителу давали объединяться с поверхностно-активным веществом додецилсульфатом натрия (SDS); сульфидрил в антителе, содержащемся в испытуемом образце и в стандартном образце,

алкилировали с использованием N-этилмалеимида, и с использованием линейного раствора геля с высокой молекулярной массой в качестве просеивающей среды, фрагменты, интактные белки и агрегаты могут быть разделены в зависимости от их молекулярной массы в CE-SDS при высоком электрическом поле. Время удержания и относительную интенсивность фрагментов, интактных белков и агрегатов определяли с помощью детектора PDA (фотодиодная матрица) с использованием капилляра без покрытия (внутренний диаметр: 50 мкм; длина пробирки: 30,2-31,0 см; эффективная длина: 20-21 см; и окно обнаружения: 100×200 мкм) и буфера (цитратно-фосфатный буфер, 1% SDS, pH 6,0). Образец вводили при 5 кВ в течение 40 с и детектировали при длине волны 220 нм.

Проверка видимых примесей: проводили в соответствии с Общим правилом 0904 «Проверка видимых примесей», Фармакопея Китайской Народной Республики (издание 2015 г.).

Связывающая активность IL-17A: Рекомбинантный белок IL-17A человека солибилизировали при 0,5 мкг/мл в PBS (фосфатно-солевой буфер) (10 mM, pH 7,4), и полученный раствор добавляли в количестве 100 мкл/лунка в 96-луночный планшет (Costar, кат. №: 9018), который затем герметизировали герметизирующей пленкой и оставляли при 5 ± 3 °C в течение ночи; затем планшет дважды промывали PBST (PBS с добавлением Tween), блокирующий раствор (PBST, содержащий 1% сухого обезжиренного молока) добавляли в количестве 300 мкл/лунка в планшет, и планшет встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Испытуемый образец, стандартный образец и контрольный образец качества разводили до 500 нг/мл с помощью PBST, соответственно, и подвергали 1,9-кратному градиентному разбавлению для получения разведений концентраций в диапазоне от 0,43 нг/мл до 500 нг/мл. Разведения испытуемого стандарта и испытуемого образца добавляли в количестве 100 мкл/лунка в заблокированный планшет, который затем встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем планшет промывали 4 раза промывочным раствором, а затем в планшет добавляли козы антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена (PBST, 1:80000) в количестве 100 мкл/лунка, планшет затем встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшет снова промывали промывочным раствором, добавляли раствор субстрата в количестве 100 мкл/лунка и помещали планшет в темноту на 30 мин перед добавлением 50 мкл останавливающего раствора для остановки реакции. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с помощью считывателя микропланшетов с эталонной длиной волны 620 нм. Результаты измерений регистрировали и рассчитывали удельную активность (формула:

100%×EC50 (полумаксимальная эффективная концентрация) стандартного образца/EC50 образца).

FlowCAM: перед загрузкой любого образца проточную ячейку сначала промывали водой Milli-Q в течение 3-9 проходов до тех пор, когда становилось невозможно обнаружить какие-либо частицы. Испытуемый образец в 4 раза разбавляли водой Milli-Q и оставляли при комнатной температуре в течение 15 мин. Для обнаружения использовали 500 мл разведения и обнаруживали частицы в диапазоне от 2 мкм до 2000 мкм.

LC-MS (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) (анализ окисления): отбирали соответствующее количество образца, подвергали обработке, включающей денатурирование, восстановление, алкилирование и обессоливание, а затем добавляли трипсин для расщепления; и полученный образец вводили во флакон для UPLC (сверхэффективная жидкостная хроматография) с образцом и анализировали с помощью UPLC-MS (UPLC с масс-спектрометрией). Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Waters MassLynx 4.1, а коэффициент окисления рассчитывали путем спектрометрии с экстрагированными ионами (EIC).

Анализ вязкости: Образцы анализировали с помощью реометра Brookfield DV-III. После обнуления с использованием стандарта добавляли 0,5-1,0 мл образца и выбирали соответствующую скорость для обеспечения крутящего момента в диапазоне от 10 до 100% и считывали значение вязкости.

Пример 1 Скрининг pH (LZM012 20170815-Liq1)

Эксперимент по скринингу pH для препарата LZM012 был основан на платформенном препарате (100 мг/мл LZM012, 25 mM гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80), и была разработана серия уровней pH (5,0, 5,5, 6,0, 6,5) для скрининга наиболее подходящего значения pH.

Состав препарата приведен в таблице 1.

Таблица 1. Препараты LZM012

	LZM012	pH
F1	100 мг/мл	5,0
F2		5,5
F3		6,0
F4		6,5

На ультрарастительном боксе отбирали 12 мл платформенного препарата при pH 5,5 и добавляли в препарат 0-300 мкл 0,5 M HCl или 0,5 M NaOH для доведения pH до 5,0, 5,5,

6,0 или 6,5, соответственно. Препараты стерильно фильтровали с использованием фильтра 0,22 мкм, и каждый заполняли во флакон объемом 2 мл для инъекций с объемом 1 мл, который затем закупоривали и закрывали крышкой.

Результаты анализа DSC представлены в таблице 2 и показывают следующее: в диапазоне pH 5,0-6,5 Tonset (температура начала) и Tm1 (температура разворачивания 1) увеличивались с увеличением значения pH; существенной разницы в Tm2 между группами pH 5,5 до pH 6,5 по существу не наблюдалось, и наблюдалось небольшое снижение Tm2 (Fab) (1-2 °C) препарата при pH 5,0. Таким образом, молекула LZM012 имеет оптимальную термическую стабильность в диапазоне pH 5,5-6,5.

Таблица 2. Результаты анализа DSC препарата LZM012

F	Tonset (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
F1-pH 5,0	57,56	65,92	81,25
F2-pH 5,5	61,14	69,50	83,44
F3-pH 6,0	63,63	71,99	83,14
F4-pH 6,5	64,18	73,92	83,68

Кроме того, эксперименты по стабильности, показанные в таблице 3, проводили в условиях ускоренного старения при 40 °C (40±2 °C).

Результаты анализа методом SEC-HPLC показали, что при pH 6,5 и pH 5,0 было обнаружено больше агрегатов, и предпочтительный диапазон pH с меньшим количеством агрегатов составлял от pH 5,5 до pH 6,0.

Результаты анализа WCX-HPLC и nR CE-SDS не показали существенной разницы в поверхностном заряде и чистоте по сравнению с pH 5,0-6,5.

Результаты анализа внешнего вида и контроля видимых примесей показаны на фиг. 1. Результаты показали, что в условиях ускоренного старения при 40 °C в течение 11 дней частицы агрегатов белка появлялись в различных степенях в препаратах при pH 5,0, pH 5,5 и pH 6,5. Среди препаратов большее количество агрегатов присутствовало в препаратах при pH 5,0 и pH 6,5, в которых была видна дымчатая агрегация; напротив, препарат при pH 6,0 был чистым и прозрачным. Таким образом, pH 6,0 является более благоприятным для поддержания нативной конформации белка.

Результаты анализа активности связывания с IL-17 не показали существенной разницы в активности препаратов при pH 5,0, pH 5,5 и pH 6,5 в момент получения и в день 11 в условиях ускоренного старения при 40 °C.

Результаты обнаружения невидимых частиц (FlowCAM) не показали существенной

разницы в невидимых частицах в препаратах при pH 5,0, pH 5,5 и pH 6,5 в момент после получения, а также в день 11 и день 20 в условиях ускоренного старения при 40 °C.

Подробные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты ускоренного теста стабильности при 40 °C

		День 0				40 °C, день 11				40 °C, день 20			
		F1 pH 5,0	F2 pH 5,5	F3 pH 6,0	F4 pH 6,5	F1 pH 5,0	F2 pH 5,5	F3 pH 6,0	F4 pH 6,5	F1 pH 5,0	F2 pH 5,5	F3 pH 6,0	F4 pH 6,5
SEC- HPLC (%)	Мономер	98,8	99,7	99,5	99,1	94,9	96,0	95,2	94,3	91,2	92,0	90,8	88,8
	Агрегат	1,2	0,3	0,5	0,9	3,1	2,2	2,2	2,5	5,4	4,6	4,9	5,2
	Разложе ние	N.D. (нет данн ых)	N.D.	N.D.	N.D.	2,0	1,8	2,7	3,2	3,4	3,4	4,3	6,0
CE-SDS в невосста навливаю щих условиях (%)	Чистота	97,1	97,0	97,2	97,0	94,4	95,2	94,1	92,1	91,1	90,7	89,3	88,1
	Фрагмен т	2,9	2,9	2,8	3,0	5,1	4,4	5,5	7,5	7,1	7,5	8,9	10,2
	Агрегат	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,6	0,4	0,4	0,4	1,8	1,8	1,9	1,7
WCX- HPLC перед фермента тивным расщепле нием (%)	Главный пик	62,6	63,3	62,6	62,51	48,7	48,5	49,3	49,7	41,3	40,7	41,5	40,5
	Кислотн ый пик	16,7	16,9	17,2	17,6	30,2	32,8	32,7	33,1	38,2	41,3	41,9	43,9
	Основно й пик	20,7	19,8	20,2	19,9	21,1	18,6	18,0	17,3	20,5	17,9	16,6	15,6
Связывающая активность с IL-17 (%)		102	105	103	93	103	101	103	102	/	/	/	/
FlowCAM	2-10	3161	6141,	7026	9875,	28511	7622	17389	8980	1542	5155	9280	9092

(%)	мкм		5		5								
	10-25												
	мкм	151	433	254,5	564	1733	568	970,5	719	363	446	522	658
	более 25												
	мкм	10	0	22	60,5	194,5	86,5	108	72	76	53	15	38

Таким образом, из всестороннего анализа вышеуказанных результатов видно, что лучшая термостабильность молекулы достигается в диапазоне pH 5,5-6,5, согласно результатам DSC; в то время как лучшая чистота и внешний вид достигаются при pH 5,5-6,0. Таким образом, в целом pH должен находиться в диапазоне pH 5,5-6,0, а значение pH как можно ближе к 6,0 является лучшим. Таким образом, можно определить pH $6,0 \pm 0,3$.

Пример 2 Исследование вязкости (LZM012 20170829-Liq3)

Исследование показало, что LZM012 продемонстрировал высокую гидрофобность белка, а платформенный препарат (100 мг/мл LZM012, 25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0) содержал относительно высокую концентрацию LZM012 и имел вязкость 14 сП, превышающей внутренний контрольный стандарт, который составлял 10 сП. Таким образом, считалось, что в препарат добавлен понизитель вязкости для снижения вязкости препарата.

В настоящем примере представлены исследования способности двух эксципиентов, NaCl и аргинина снижать вязкость. Препараты и результаты анализа вязкости представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты анализа вязкости в LZM012 20170829-Liq3

F	Препарат	Вязкость (сП)
F1-NaCl	100 мг/мл LZM012, 25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 9 мг/мл NaCl, 0,5 мг/мл полисорбата 80	5,8
F2-аргинин	100 мг/мл LZM012, 25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 100 мМ аргинина, 0,5 мг/мл полисорбата 80	5,5
F3-контроль	100 мг/мл LZM012, 25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80	13,9

Препараты F1, F2 и F3, показанные в таблице 4, получали путем добавления соответствующих количеств исходного раствора LZM012 (130 мг/мл LZM012, 25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80) в рецептурный буфер 1 (25 мМ

гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 39,15 мг/мл NaCl, 0,5 мг/мл полисорбата 80), рецептурный буфер 2 (25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 432 мМ аргинина, 0,5 мг/мл полисорбата 80) и рецептурный буфер 3 (25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80), соответственно.

Результаты анализа показали, что как 9 мг/мл NaCl, так и 100 мМ аргинина способны снижать вязкость препаратов LZM012 до уровня ниже 10 сП, при этом не показано существенной разницы в их способности снижать вязкость. Таким образом, как NaCl, так и аргинин были выбраны для использования в качестве понизителя вязкости для препарата LZM012.

Пример 3 Скрининг ингредиентов (LZM012 20170925-Liq4)

Известно, что в биологических продуктах, продаваемых как внутри страны, так и за рубежом, полисорбат 80 (PS80) часто используется в концентрации от 0,05 до 2 мг/мл. В соответствии с этим диапазоном концентраций, была выбрана концентрация PS80 0,5 мг/мл, которая была добавлена в препарат LZM012, чтобы солубилизовать белок и предотвратить агрегацию и адсорбцию белка.

На основании определения pH 6,0 и 0,5 мг/мл PS80, типы буферной системы и стабилизатора были подвергнуты следующему скринингу. В основном исследовали 3 буферные системы, то есть гистидин, цитрат и ацетат (НАс), и 3 стабилизатора, то есть трегалозу, сахарозу и аргинин. Поскольку LZM012 имел высокую вязкость, в настоящем примере 9 мг/мл NaCl добавляли к препаратам, не содержащим аргинина, для снижения вязкости. Ингредиенты препаратов подробно представлены в таблице 5.

Таблица 5. Препараты в LZM012 20170925-Liq4

F	LZM012	pH	Буфер	Стабилизирующий агент	Поверхностно-активное вещество
F1	100 мг/мл	6,0	25 мМ гистидина	80 мг/мл трегалозы, 0,9% NaCl	0,5 мг/мл полисорбата 80
F2	100 мг/мл	6,0	25 мМ гистидина	80 мг/мл сахарозы, 0,9% NaCl	0,5 мг/мл полисорбата 80
F3	100 мг/мл	6,0	25 мМ гистидина	150 мМ аргинина	0,5 мг/мл полисорбата 80
F4	100 мг/мл	6,0	20 мМ цитрата	80 мг/мл трегалозы, 0,9% NaCl	0,5 мг/мл полисорбата 80
F5	100 мг/мл	6,0	20 мМ цитрата	80 мг/мл сахарозы, 0,9% NaCl	0,5 мг/мл полисорбата 80

F6	100 мг/мл	6,0	20 мМ цитрата	150 мМ аргинина	0,5 мг/мл полисорбата 80
F7	100 мг/мл	6,0	20 мМ НАс	80 мг/мл трегалозы, 0,9% NaCl	0,5 мг/мл полисорбата 80
F8	100 мг/мл	6,0	20 мМ НАс	80 мг/мл сахарозы, 0,9% NaCl	0,5 мг/мл полисорбата 80
F9	100 мг/мл	6,0	20 мМ НАс	150 мМ аргинина	0,5 мг/мл полисорбата 80

Соответствующее количество очищенного промежуточного соединения LZM012 отбирали и подвергали замене буфера с использованием ультрафильтрационного центрифугирования в соответствии с таблицей 5. Концентрацию белка в растворе, полученном после замены буфера, доводили соответственно до 100 мг/мл с использованием соответствующих рецептурных буферов. Каждый из полученных препаратов стерильно фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и помещали во флакон для инъекций, который затем закупоривали и закрывали крышкой.

Эксперименты по стабильности проводили в условиях ускоренного старения при 40 °C (40±2 °C).

Результаты анализа способом SEC-HPLC показаны на 2А, где показано, что содержание агрегатов в препаратах, содержащих гистидиновые и ацетатные буферные системы, было значительно выше, чем в препаратах, содержащих цитратный буфер, что указывает на то, что цитратная буферная система была более благоприятной для стабильности молекул LZM012; кроме того, между препаратами, содержащими 3 различных стабилизатора с цитратной буферной системой, не наблюдалось существенной разницы в содержании агрегатов.

Результаты анализа WCX-HPLC показаны на 2В, где показано, что процентное содержание главного пика препаратов, содержащих гистидиновую и ацетатную буферные системы, было значительно ниже, чем у препаратов, содержащих цитрат; кроме того, не наблюдалось существенной разницы в процентном содержании главного пика между препаратами, содержащими 3 различных стабилизатора с цитратной буферной системой.

Результаты анализа CE-SDS в невосстанавливающих условиях показаны на 2С, где показано, что чистота препаратов, содержащих гистидиновые и ацетатные буферные системы, была значительно ниже, чем у препаратов, содержащих цитрат; кроме того, не наблюдалось существенной разницы в чистоте между препаратами, содержащими 3 различных стабилизатора с цитратной буферной системой.

Таким образом, в качестве буфера для препарата LZM012 была выбрана цитратная буферная система. Три стабилизатора существенно не отличаются в поддержании стабильности белка LZM012, но когда цитратный буфер идентифицируют как буферную систему, подлежащую использованию, сахарид может несколько облегчить боль при инъекции, вызванную цитратным буфером. Следовательно, сахарозу или трегалозу предпочтительно использовали в качестве стабилизатора для препарата LZM012; но также можно использовать аргинин. По сравнению с трегалозой сахароза стоит дешевле, поэтому, исходя из экономических преимуществ, сахароза может быть выбрана в качестве стабилизатора для препарата LZM012.

Пример 4 Исследование, относящееся к понизителю вязкости в цитратной буферной системе

4.1 Влияние различных концентраций NaCl на вязкость препарата LZM012

Предпочтительный препарат анализировали с помощью скрининга ингредиентов в Liq4, представленном в Примере 3: 100 мг/мл LZM012, 20 мМ цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 9 мг/мл NaCl, 0,5 мг/мл PS80, pH 6,0, и осмотическое давление препарата составляло 666 мОсм/кг. В настоящем примере представлены исследования влияния различных концентраций хлорида натрия (9, 6, 3 и 0 мг/мл NaCl) на вязкость препарата LZM012, который был основан на предпочтительном препарате.

Препарат из 100 мг/мл LZM012, 20 мМ цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл PS80, был выбран pH 6,0, и твердый NaCl был добавлен в препарат для доведения содержания NaCl в препарате до 9, 6, 3 или 0 мг/мл.

Результаты анализа вязкости препаратов, содержащих различные концентрации хлорида натрия, показаны на фиг. 3, где показано, что вязкость препарата увеличивалась с увеличением концентрации NaCl. При полном отсутствии хлорида натрия вязкость раствора составляла 8,48 сП, а теоретическое осмотическое давление раствора было близко к изотоническому. В сравнении с результатами эксперимента для Liq3, представленными в примере 2 (препарат содержал 100 мг/мл LZM012, 25 мМ гистидина, 80 мг/мл трегалозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0, и имел вязкость 14 сП), результаты показали, что цитратный буфер сам по себе обладает способностью к снижению вязкости. Таким образом, в препарат LZM012 не нужно добавлять понизитель вязкости, такой как NaCl или т. п., если цитрат используется в качестве буферной системы для LZM012, и вязкость препарата может соответствовать стандарту внутреннего контроля (10 сП или менее).

4.2 Влияние на стабильность при отсутствии NaCl (LZM012 20171115-Liq5)

На основании препарата, выбранного при скрининге ингредиентов для Liq4,

сравнивали стабильность препарата, содержащего 9 мг/мл NaCl, и препарата, не содержащего NaCl, чтобы исследовать, повлияет ли отсутствие NaCl на стабильность молекулы LZM012.

Препарат F1: 100 мг/мл LZM012, 20 mM цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 9 мг/мл NaCl, 0,5 мг/мл PS80, pH 6,0;

Препарат F2: 100 мг/мл LZM012, 20 mM цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл PS80, pH 6,0.

Соответствующее количество NaCl добавляли в препарат LZM012 (100 мг/мл LZM012, 20 mM цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл PS80, pH 6,0) для доведения концентрации NaCl до 9 мг/мл, и затем получали препарат F1. Ингредиенты препарата F2 аналогичны ингредиентам препарата LZM012.

Результаты анализов SEC-HPLC и WCX-HPLC показаны на 4A и 4B, соответственно, где показано, что присутствие или отсутствие хлорида натрия не оказывало очевидного влияния на стабильность молекулы LZM012.

4.3 Краткое описание восстановителя вязкости NaCl

Из исследований вязкости и стабильности можно определить, что в препарате LZM012, содержащем 100 мг/мл антитела, когда в качестве буферной системы в нем используют цитрат, не нужно добавлять понизитель вязкости, такой как NaCl или тому подобное. Таким образом, препарат LZM012 окончательно определяется как: 100 мг/мл LZM012, 20 mM цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл PS80, pH 6,0; или 100 мг/мл LZM012, 20 mM цитратного буфера, 150 mM аргинина, 0,5 мг/мл PS80, pH 6,0.

Пример 5 Исследование совместимости сыворотки (LZM012 20171129-Liq7)

После того, как инъекция, содержащая лекарственный препарат, подкожно вводится в организм человека, она мгновенно разбавляется сывороткой, после чего постепенно абсорбируется организмом человека, и концентрация лекарственного препарата постепенно снижается. В исследовании, представленном в настоящем примере, сыворотку крови человека использовали для разбавления препарата 100 мг/мл LZM012 до серии концентраций белка (20 мг/мл, 12 мг/мл, 8 мг/мл, 4 мг/мл, 2 мг/мл, 0 мг/мл), чтобы имитировать процесс, посредством которого лекарственная форма 100 мг/мл LZM012 постепенно абсорбируется после подкожной инъекции. Изменения образцов при 37 ± 2 °C контролировали с помощью проверки видимых примесей для исследования совместимости белка LZM012 с человеческой сывороткой.

Результаты обнаружения видимых примесей в образцах, подвергнувшихся условиям ускоренного старения, при 37 ± 2 °C в течение 48 часов и в течение 7 дней, показаны на фиг. 5, где показано, что в диапазоне от 2 до 20 мг/мл LZM012, не

наблюдалось существенной разницы во внешнем виде между растворами LZM012, полученными с человеческой сывороткой, и контрольной сывороткой в течение периода исследования, и все растворы LZM012 были прозрачными без осаждения. Таким образом, в разработанном препарате (100 мг/мл LZM012, 20 мМ цитратный буфер, 80 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл PS80, pH 6,0) молекула LZM012 демонстрирует хорошую совместимость с человеческой сывороткой.

В заключение, препарат LZM012 в конечном итоге определен следующим образом: 100 мг/мл рекомбинантного гуманизированного моноклонального антитела к IL-17A/F человека LZM012, 20 мМ цитратного буфера (0,66 мг/мл лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 4,95 мг/мл цитрата натрия ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$)), 80 мг/мл сахарозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$) и 0,5 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 $\pm$ 0,3.

Пример 6 Исследование окисления (LZM012 20170829-Liq 2)

Препарат LZM012 представляет собой препарат для подкожной инъекции, который будет подвергаться воздействию воздуха в течение длительного периода времени во время получения и хранения. В настоящем примере представлены исследования влияния кислорода на стабильность молекулы в препарате LZM012, результаты которых были использованы в качестве эталона для принятия решения о том, следует ли добавлять антиоксидант в препарат.

Пилотный производственный образец был получен с конечным препаратом LZM012 (100 мг/мл LZM012, 20 мМ цитратного буфера, 80 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0), и чистый кислород был подан в производственный образец LZM012 (F1). Процесс подачи кислорода продолжался 20 минут для насыщения кислородом препарата, а затем полученный образец помещали в инкубатор при 25 $\pm$ 2 °C вместе с необработанным контролем (F2) для испытания стабильности.

Результаты испытаний стабильности представлены в таблице 6.

Таблица 6. Данные по стабильности препарата LZM012 (окончательный препарат) в условиях ускоренного окисления

Объекты испытания		День 0	25 °C, день 2		25 °C, 1 неделя	
			F1-O ₂	F2- контрольн ый образец	F1-O ₂	F2- контрольны й образец
SEC (%)	Мономер	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2
	Агрегат	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
	Разложение	менее 0,4	менее 0,4 (LOD)	менее 0,4	менее 0,4	менее 0,4

		(LOD, предел обнаружения)		(LOD)	(LOD)	(LOD)
CE-SDS в невосстанав ливающих условиях (%)	Чистота	96,7	96,6	96,6	96,5	96,5
	Фрагмент	3,3	3,4	3,4	3,5	3,5
	Агрегат	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
WCX-HPLC перед ферментати вным расщеплени ем (%)	Главный пик	59,8	59,8	60	59,8	59,3
	Кислотный пик	19,5	19,5	19,7	20,1	19,8
	Основной пик	20,8	20,7	20,4	20,1	20,9
FlowCAM (ч/мл)	2-10 мкм	1129	492	178	110	153
	10-25 мкм	59	34	34	0	0
	более 25 мкм	0	8	0	0	0
Окисление*	M105 (2T11)	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
	M253 (2T20)	6,4%	6,7%	7,0%	6,8%	6,5%

*: числа, следующие за M, представляют собой положения метионина в пептидных цепях, числа, предшествующие T, представляют собой легкую или тяжелую цепь (1 представляет собой легкую цепь, и 2 представляет собой тяжелую цепь), а T и числа, следующие за T, представляют собой пептидный фрагмент, полученный ферментативным расщеплением. Например: 1T1 означает первый пептидный фрагмент легкой цепи.

Результаты не показали существенной разницы в отношении этих физико-химических аналитических показателей между экспериментальной группой, подвергавшейся обработке кислородом, (F1-O₂) и контрольной группой (F2-контроль); и масс-спектрометрический анализ показал, что для 2 молекул Met (метионин) в LZM012, которые относительно релевантны процессу окисления, не наблюдалось существенной разницы в окислении между двумя группами (изменение выше 2% означает существенную разницу). Следовательно, в препарат LZM012 не нужно добавлять

антиоксидант.

Пример 7 Анализ активности препарата LZM012

Три опытных производственных образца были получены с окончательным препаратом с помощью оптимизированного процесса, и их активность была проанализирована и представлена в таблице 7. Можно увидеть, что препарат по-прежнему эффективен и обладает биологической активностью в долгосрочных условиях и условиях ускоренного старения.

Таблица 7. Данные по активности связывания LZM012 в пилотных партиях с IL-17A

Партия №	Момент получения	Долгосрочная стабильность (5±3 °C)			Стабильность в условиях ускоренного старения (25±2 °C)			
		3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	1 месяц	2 месяца	3 месяца	6 месяцев
201801003	99%	96%	99%	101%	102%	94%	95%	96%
201804009	93%	105%	97%	96%	105%	97%	97%	96%
201804010	102%	99%	100%	99%	98%	101%	99%	94%

Примечание: приемлемым стандартом активности является следующий: относительная активность по сравнению с аналитическим стандартным образцом должна составлять от 70% до 130%.

Вышеприведенное описание вариантов осуществления настоящего изобретения не предназначено для ограничения настоящего изобретения, и специалисты в данной области техники могут вносить различные изменения и модификации в настоящее изобретение без отступления от сущности настоящего изобретения, которые будут подпадать в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий препарат, содержащий антитело к IL-17 (интерлейкин 17) в концентрации от 20 до 200 мг/мл, цитратный буфер в концентрации от 10 до 50 mM, сахарозу в концентрации от 20 до 120 мг/мл или аргинин в концентрации от 50 до 250 mM, и полисорбат 80 в концентрации от 0,1 до 5 мг/мл, где указанный жидкий препарат имеет pH $6,0 \pm 0,5$; где антитело к IL-17 представляет собой антитело к IL-17A/F.

2. Жидкий препарат по п. 1, где антитело к IL-17 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и содержит в указанной вариабельной области тяжелой цепи CDR1 (область 1, определяющая комплементарность) (CDR1H), как показано в SEQ ID NO: 1, CDR2 (CDR2H), как показано в SEQ ID NO: 2, и CDR3 (CDR3H), как показано в SEQ ID NO: 3; и содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и содержит в указанной вариабельной области легкой цепи CDR1 (CDR1L), как показано в SEQ ID NO: 4, CDR2 (CDR2L), как показано в SEQ ID NO: 5, и CDR3 (CDR3L), как показано в SEQ ID NO: 6;

предпочтительно, антитело к IL-17 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 8;

более предпочтительно, антитело к IL-17 содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 10;

еще более предпочтительно, антитело к IL-17 представляет собой моноклональное антитело к IL-17A/F, содержащее две тяжелые цепи (HC), каждая из которых содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 9, и две легкие цепи (LC), каждая из которых содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 10.

3. Жидкий препарат по п. 1 или 2, где концентрация антитела к IL-17 составляет от 80 до 130 мг/мл, предпочтительно от 90 до 110 мг/мл и более предпочтительно составляет 100 мг/мл.

4. Жидкий препарат по любому из пп. 1-3, где концентрация цитратного буфера составляет от 15 до 30 mM, предпочтительно от 15 до 25 mM, и более предпочтительно составляет 20 mM;

предпочтительно, цитратный буфер представляет собой буфер лимонная кислота-цитрат натрия, и более предпочтительно, цитратный буфер состоит из 0,66 мг/мл

лимонной кислоты и 4,95 мг/мл дигидрата цитрата натрия.

5. Жидкий препарат по любому из пп. 1-4, где концентрация сахарозы составляет от 60 до 100 мг/мл, предпочтительно от 70 до 90 мг/мл и более предпочтительно составляет 80 мг/мл;

альтернативно, концентрация аргинина составляет от 80 до 200 мМ, предпочтительно от 100 до 170 мМ, и более предпочтительно составляет 150 мМ.

6. Жидкий препарат по любому из пп. 1-5, где концентрация полисорбата 80 составляет от 0,1 до 2,0 мг/мл и более предпочтительно составляет 0,5 мг/мл.

7. Жидкий препарат по любому из пп. 1-6, имеющий pH $6,0 \pm 0,3$, предпочтительно 6,0.

8. Жидкий препарат по любому из пп. 1-7, не содержащий антиоксиданта, такого как метионин; и/или не содержащий понизителя вязкости; предпочтительно не содержащий хлорида натрия.

9. Жидкий препарат по любому из пп. 1-8, содержащий антитело к IL-17 в концентрации 100 мг/мл, цитратный буфер в концентрации 20 мМ, сахарозу в концентрации 80 мг/мл или аргинин в концентрации 150 мМ, и полисорбат 80 в концентрации 0,5 мг/мл; и имеющий pH 6,0.

10. Жидкий препарат по любому из пп. 1-9, представляющий собой фармацевтический препарат антитела к IL-17;

предпочтительно находящийся в форме раствора, эмульсии или суспензии, предпочтительно представляющий собой раствор;

где предпочтительно фармацевтический препарат вводят парентерально, предпочтительно путем инъекции и более предпочтительно путем подкожной инъекции.

11. Применение жидкого препарата по любому из пп. 1-10 при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с IL-17A и/или IL-17F;

где предпочтительно заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки, остеоартрита и воспалительного заболевания кишечника.

12. Способ лечения заболевания, связанного с IL-17A и/или IL-17F, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества жидкого препарата по любому из пп. 1-10;

где предпочтительно заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки, остеоартрита и воспалительного

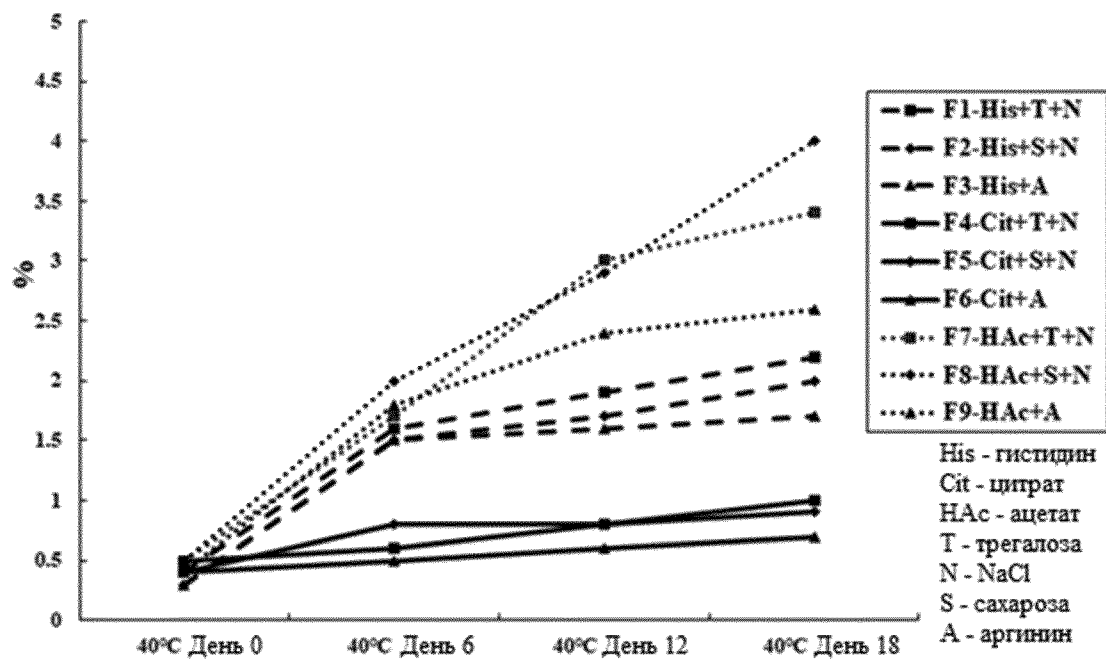
заболевания кишечника;

предпочтительно, субъект является млекопитающим, таким как примат, более предпочтительно человеком.

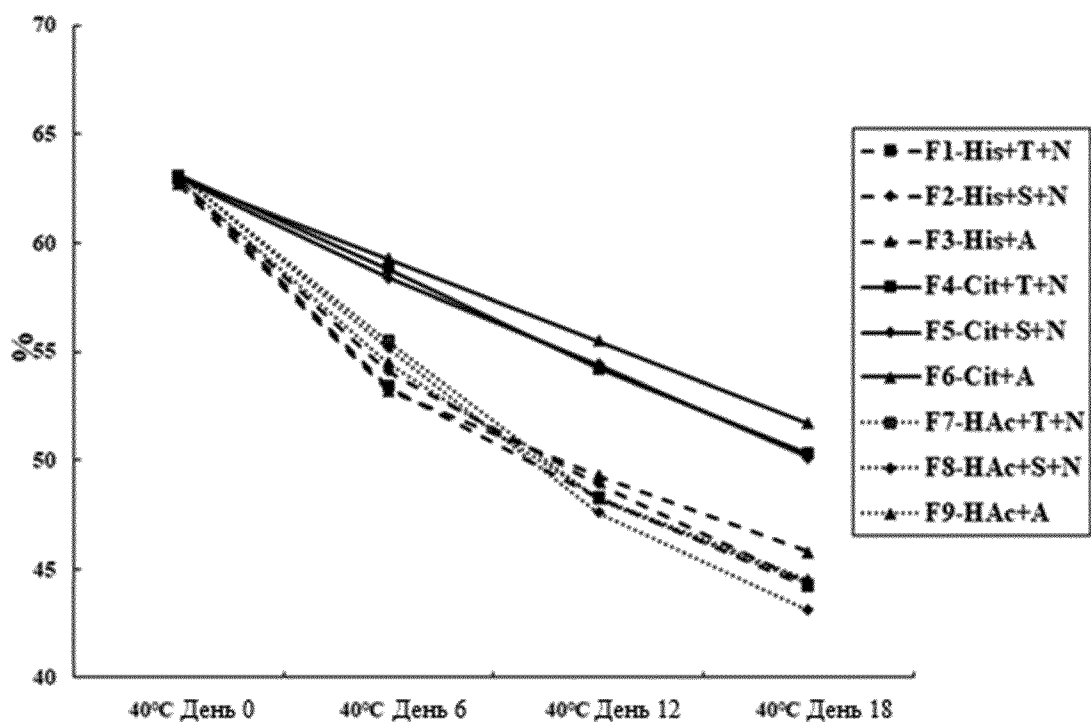
13. Контейнер или набор, включающий его, контейнер или набор, содержащий жидкий препарат по любому из пп. 1-10.



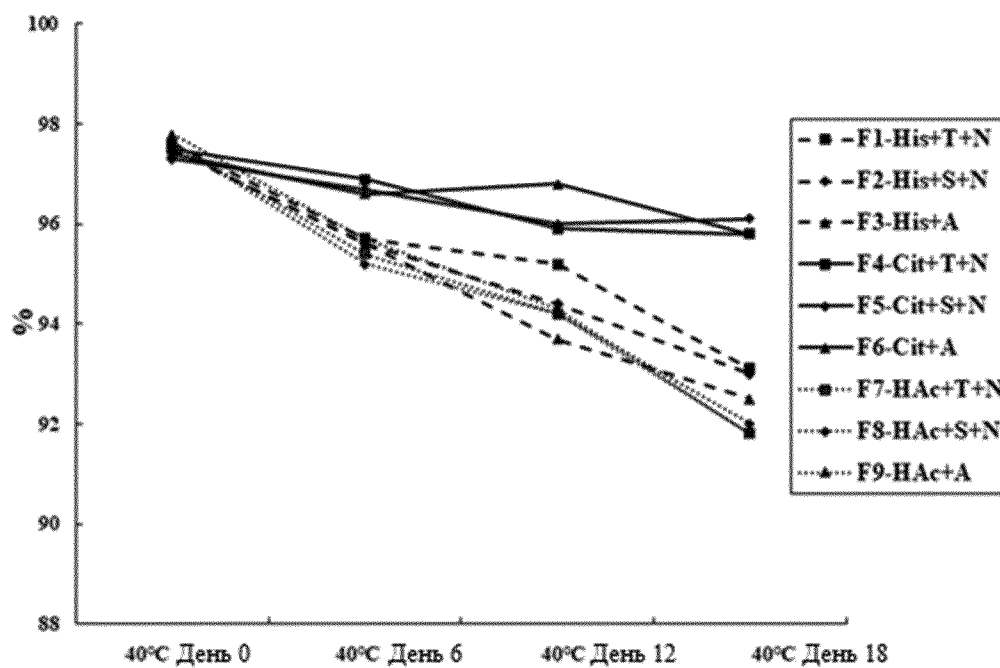
Фиг. 1



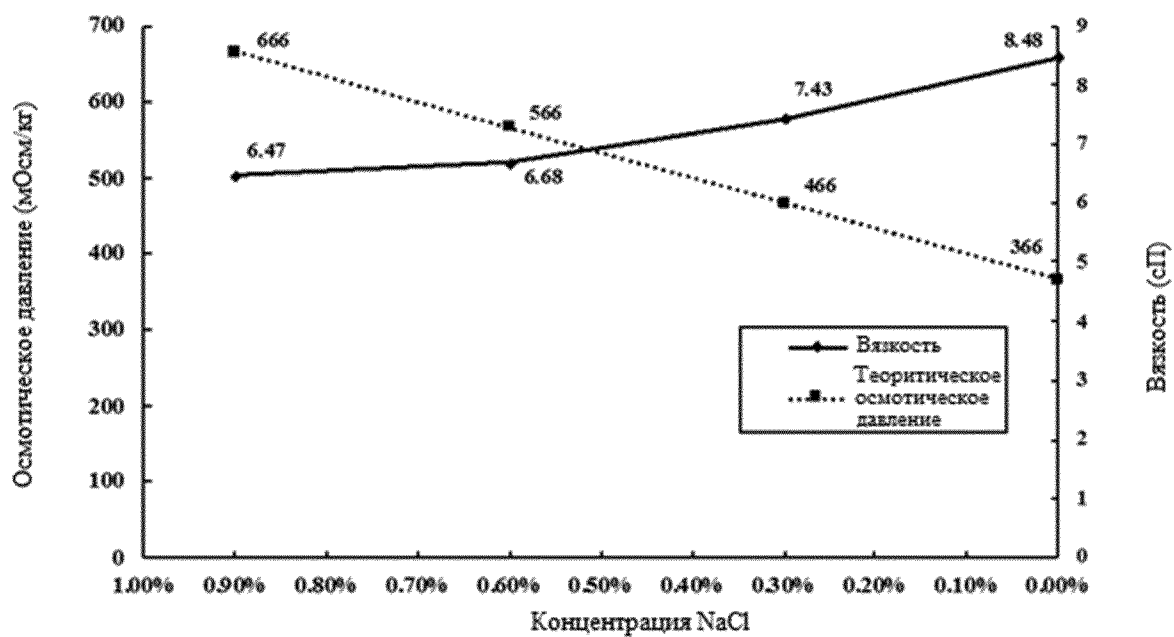
Фиг. 2А



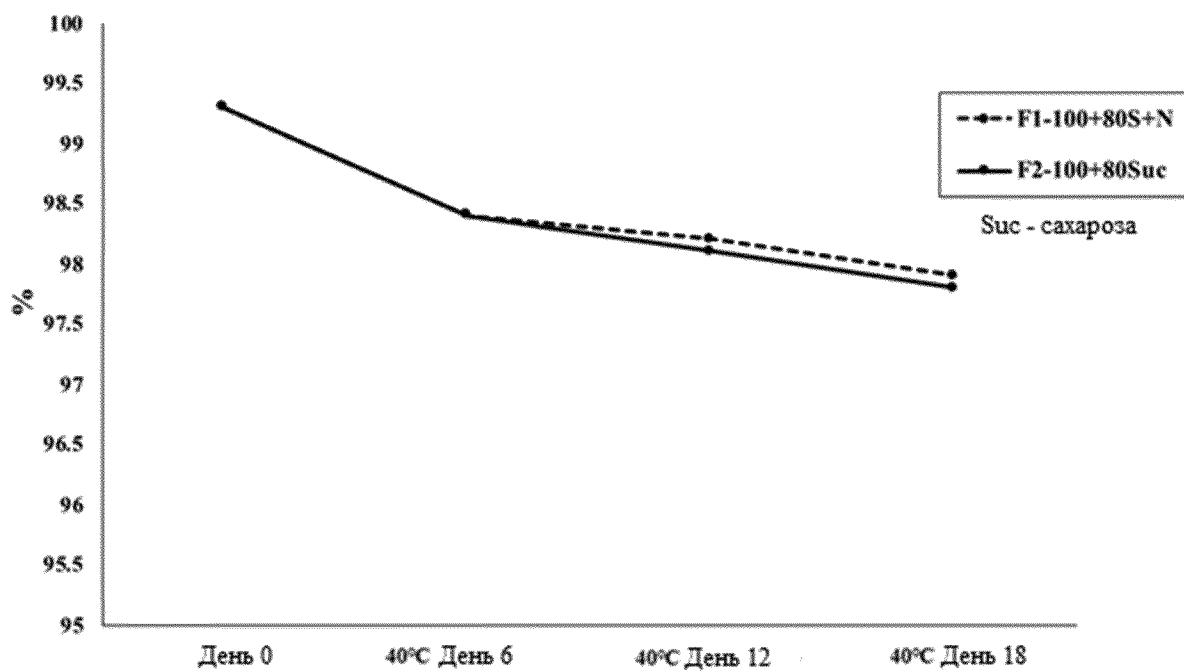
Фиг. 2В



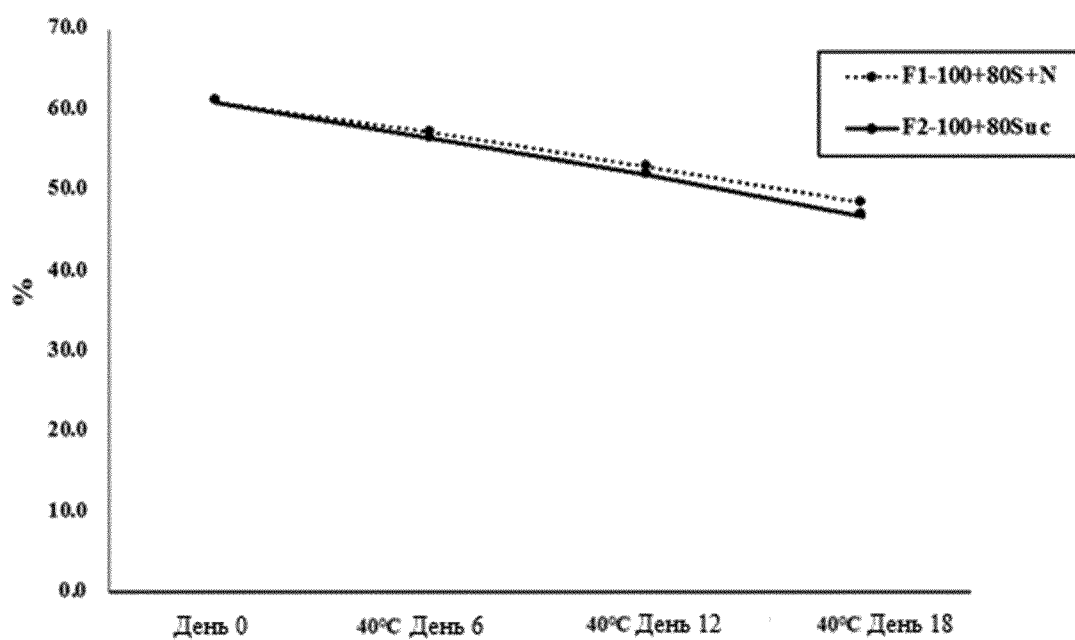
Фиг. 2С



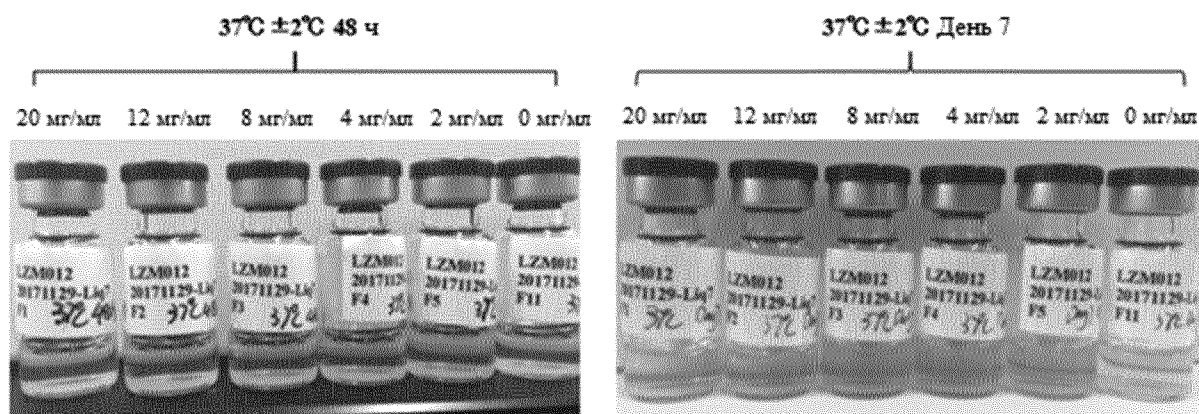
Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5