(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291857 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.23

(22) Дата подачи заявки
2020.12.07

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)

(54) СТАБИЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ МУЛЬТИМЕРОВ Fc

(31) **19214265.1**
(32) **2019.12.06**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2020/084919**
(87) **WO 2021/111007 2021.06.10**

(71) Заявитель:
КСЛ БЕРИНГ ЛЕНГНАУ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Абдул Фаттах Мохамад Ахмад Мохамад (EG), Гарви Меган (AU), Поццоли Микеле (IT), Тилли Адам, Цирикис Питер (AU)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В заявке описана среди прочего композиция мультимера Fc, композиция мультимера Fc, содержащая композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, в лиофилизированной форме, а также композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, предназначенную для применения при лечении аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания.

202291857 A1

202291857 A1

141280

СТАБИЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ МУЛЬТИМЕРОВ Fc

Настоящее изобретение относится среди прочего к композиции мультимера Fc, композиции мультмера Fc, содержащей композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, в лиофилизированной форме, а также к композиции мультимера Fc, предлагаемой в изобретении, предназначенной для применения для лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания.

Предпосылки создания изобретения

Иммуноноглобулины играют важную роль в иммунной системе млекопитающих. Они продуцируются В-лимфоцитами, присутствующими в плазме крови, лимфе и других секретах организма. Основной единицей иммуноглобулинов является гетеротетрамер, который содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, сцепленные дисульфидными связями. Каждая из указанных цепей имеет вариабельную область на ее N-конце, которая образует антигенсвязывающий центр, и константные области, ответственные за эффекторные функции иммуноглобулинов.

Известно пять основных классов иммуноглобулинов с различными биохимическими и физиологическими свойствами: IgG (тяжелая γ-цепь), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) и IgE (ε). Человеческий IgG является наиболее часто встречающимся иммуноглобулином в плазме, в то время как IgA представляет собой основной класс антител в наружных секретах, таких как слюна, слезы и слизь респираторного и кишечного трактов. IgM несомненно представляет собой физически наиболее крупное антитело в кровеносной системе человека, как правило, присутствующее в виде пентамера основной единицы иммуноглобулина, и он появляется на ранних стадиях развития инфекции.

Fc-область («кристаллизующийся фрагмент») представляет собой хвостовую область иммуноглобулина и содержит два С-концевых домена тяжелых цепей в иммуноглобулинах классов IgG и IgA и три С-концевых домена тяжелых цепей в иммуноглобулинах классов IgM и IgE.

IgG-продукты, очищенные из человеческой плазмы, которые, как правило, вводят внутривенно (IVIG) или подкожно (SCIG), в настоящее время применяют в ряде клинических практик. Установлено, что помимо традиционного применения для лечения первичных или приобретенных иммунодефицитов и инфекционных заболеваний указанные продукты обладают также эффективностью при лечении аутоиммунных заболеваний и некоторых неврологических расстройств, таких как CIDP (хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия).

Механизм действия IVIG/SCIG-продуктов, используемых для лечения аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и неврологических расстройств, вероятно, базируется в основном на эффекторных функциях молекулы IgG, опосредуемых Fc-областью. Fc –область ответственна за взаимодействие с Fc-рецепторами и системой комплемента, проявляя тем самым иммуномодулирующую активность.

Fc-рецепторы представляют собой рецепторы на наружной поверхности клеток иммунной системы, таких как человеческие тромбоциты, тучные клетки, фагоциты, такие как макрофаги и моноциты, гранулоциты, такие как нейтрофилы, базофилы и эозинофилы, а также лимоциты врожденной иммунной системы (естественные клетки-киллеры) или адаптивной иммунной системы (например, B-клетки). Связывание Fc-области антитела, которое через его Fab-фрагмент присоединяется к антигену (такому как микробный патоген), как правило, приводит к присоединению патогена к клеткам иммунной системы. В результате достигается согласованное действие против патогена.

Система комплемента представляет собой часть иммунной системы, которая атакует клеточную мембрану патогена путем формирования трансмембранных каналов, разрушающих клеточную мембрану патогена. Следствием этого является лизис клетки и гибель патогена. Кроме того, активация системы комплемента приводит к стимуляции фагоцитов для удаления чужеродного и поврежденного материала и воспаления для привлечения дополнительных фагоцитов.

Изучается несколько стратегий для замены IVIG/SCIG при лечении аутоиммунных, воспалительных и неврологических расстройств. Одним из подходов является применение только Fc-участков IgG в высокой концентрации

или рекомбинантная сборка нескольких Fc-участков в одной молекуле, например, для повышения авидности Fc-участков к Fc-рецепторам. Различные конфигурации мультимерных молекул Fc описаны, например, в WO 2008/151088 A2. Описаны предпочтительные конструкции с различными конфигурациями 2-10 Fc-участков (см. заявку на патент на имя Momenta WO 2015/168643 A2). Наиболее предпочтительным вариантом являлась трехвалентная молекула Fc человеческого IgG1, полученная из двух длинных цепей двух полипептидов Fc, связанных гибким пептидным линкером, и двух коротких цепей одного полипептида Fc. Для обеспечения правильной сборки конструкции интродуцировали мутации, такие как «knob-in-hole» (выступ-во-впадину), и электростатические мутации. Другим примером является гексамерная молекула Fc, собранная путем добавления C-концевого состоящего из 18 аминокислот хвостового фрагмента IgM к полипептиду Fc IgG, описанная, например, в WO 2014/060712 A1 и WO 2017/129737 A1.

Для терапевтического применения требуются стабильные формы указанных мультимеров Fc. Однако даже индивидуальные Fc-фрагменты обладают высокой чувствительностью к физическому и химическому расщеплению, в частности, они в большой степени склонны к агрегации в растворе. Для мультимеров Fc это является еще более проблематичным. Первые попытки получения мультимера Fc в жидкой форме оказались успешными лишь при очень низкой концентрации белка (30 мг/мл). Для терапевтического применения очень желательным является более концентрированный раствор этих белков. Стабильные композиции с требуемыми высокими концентрациями белков не были получены главным образом из-за указанной выше тенденции к агрегации в растворе мультимеров Fc и повышения скорости агрегации при увеличении концентрации белка, что приводило к появлению заметного осадка. Известно, что такие осадки могут быть опасными при введении пациенту.

Таким образом, объектом настоящего изобретения является стабильная композиция мультимера Fc, имеющая более высокую концентрацию мультимера Fc, которая обеспечивает удобное введение мультимера Fc пациенту, например, путем подкожного введения.

Краткое изложение сущности изобретения

Предложена композиция мультимера Fc,

а) содержащая мультимер Fc в концентрации от 60 мг/мл до 180 мг/мл,

б) имеющая значение pH от 4,8 до 6,0 и

в) содержащая стабилизатор в концентрации от 200мМ до 450мМ.

Изобретение относится также к композиции мультимера Fc, содержащей композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, в лиофилизированной форме.

Кроме того, представлена композиция мультимера Fc, предлагаемая в изобретении, предназначенная для применения для лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания.

Подробное описание изобретения

Первым объектом изобретения является композиция мультимера Fc,

а) содержащая мультимер Fc в концентрации от 60 мг/мл до 180 мг/мл,

б) имеющая значение pH от 4,8 до 6,0 и

в) содержащая стабилизатор в концентрации от 200мМ до 450мМ.

Результаты, представленные в примерах, демонстрируют, что композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, является очень стабильной. В частности, как указано в примерах, было обнаружено, что использование условий, приведенных в формуле изобретения, предотвращает осаждение и дезамидирование белка и приводит к снижению скорости фрагментации даже в композициях мультимеров Fc, имеющих более высокую концентрацию белка.

Понятие «мультимер Fc» согласно настоящему изобретению относится к мультимеру, состоящему по меньшей мере из двух Fc-участков.

Понятия «Fc-участок», «мономер Fc» «Fc-фрагмент» или «Fc-домен», применяемые взаимозаменяемо в настоящем изобретении, относятся к молекуле, собранной из двух полипептидов Fc, которая обладает способностью связываться с Fc-рецептором.

Понятие «полипептид Fc» согласно настоящему изобретению относится к полипептидной цепи, состоящей из участков константного домена тяжелой цепи антитела.

В частности, полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит константный домен антитела (CH2 и/или CH3) или его функциональные фрагменты (например, фрагменты, которые обладают способностью к (I) димеризации с другим полипептидом Fc с образованием Fc-участка и (II) связыванию с Fc-рецептором).

Кроме того, Fc-участок может содержать любую комбинацию шарнирной области и константного CH2- и CH3- (и CH4-) участка константного домена или его фрагментов.

Понятие «константный домен CH2/CH3/CH4» согласно настоящему изобретению относится к участкам константного домена тяжелой цепи антитела.

Понятие «шарнирная область» согласно настоящему изобретению относится к гибкому сегменту полипептидной цепи константного домена тяжелой цепи антитела, основной функцией которой является связывание Fab- и Fc-участков антитела, или ее фрагменту.

В частности, полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит или состоит из полной шарнирной области или ее части и константных доменов CH2 и/или CH3, и/или CH4 антитела. Более конкретно, полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит или состоит из шарнирной области и второго и/или третьего константного домена (CH2 и/или CH3) антитела, предпочтительно шарнирной области и второго и третьего константных доменов (CH2 и CH3) антитела.

Полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь происхождение из антитела класса IgA, IgD, IgG, IgE или IgM, в частности, полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь происхождение из антитела IgG-класса, предпочтительно человеческого антитела IgG-класса, более конкретно полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь происхождение из одного из подклассов IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4 антитела IgG-класса. Более предпочтительно полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь происхождение из человеческого IgG1.

Как правило, полипептид Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, не содержит ни какую-либо часть иммуноглобулина, которая может

функционировать в качестве распознающей антиген области, ни какой-либо из определяющих комплементарность участков (CDR).

Полипептид Fc может находиться в форме дикого типа или может содержать одно или несколько изменений по сравнению с последовательностью полипептида Fc дикого типа.

Указанное изменение может представлять собой любое принятое изменение аминокислоты, известное специалисту в данной области, такое как замена, добавление или делеция аминокислоты. Кроме того, изменение может быть консервативным или представлять собой любое изменение, которое изменяет взаимодействие между двумя полипептидами Fc, между полипептидом Fc или Fc-доменом и Fc-рецептором или между полипептидом Fc или Fc-доменом и системной комплемента.

Изменение можно интродуцировать в любое положение полипептида Fc, в частности, в шарнирную область, CH2- или CH3-домен.

Приемлемые изменения известны специалисту в данной области. В частности, изменения могут представлять собой аминокислотные изменения типа «knob-into-hole», аминокислотное изменение, приводящее к образованию дисульфидных связей, аминокислотное изменение, приводящее к взаимодействиям аминокислот с противоположными зарядами, а также встраивание пептидного линкера, приводящее к улучшенному взаимодействию полипептидов Fc в Fc-участке.

Применение сконструированных полостей и сконструированных выпуклостей (или стратегия «knob-into-hole») хорошо известна специалисту в данной области и описано, например, у Carter с соавторами (Ridgway и др., Protein Eng. 9, 1996, сс. 617-612; Atwell и др., J Mol Biol. 270, 1997, сс. 26-35; Merchant и др., Nat Biotechnol. 16, 1998, сс. 677-681), а также описано в патенте США № 5731168.

Согласно настоящему изобретению сконструированные полости и сконструированные выпуклости можно применять для получения Fc-участков, указанных в настоящем описании.

Понятие «сконструированная полость» относится к замене по меньшей мере одного из исходных аминокислотных остатков, например, в константном CH3-домене, на другой аминокислотный остаток, имеющий меньший объем

боковой цепи по сравнению с исходным аминокислотным остатком, что приводит к созданию трехмерной полости, например, в константном CH3-домене.

В контексте настоящего описания понятие «сконструированная выпуклость» относится к замене по меньшей мере одного из исходных аминокислотных остатков, например, в константном CH3-домене, на другой аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи по сравнению с исходным аминокислотным остатком, что приводит к созданию трехмерной выпуклости, например, в константном CH3-домене.

Сконструированную полость можно создавать путем замены аминокислот, содержащих более крупные боковые цепи, таких как тирозин или триптофан, на аминокислоты с меньшими боковыми цепями, такие как аланин, валин или треонин. Аналогично этому, сконструированную выпуклость можно создавать путем замены аминокислот с меньшими боковыми цепями, таких как аланин, валин или треонин, на аминокислоты, содержащие более крупные боковые цепи, такие как тирозин или триптофан. Методы замены аминокислот хорошо известны специалисту в данной области.

В Fc-участке, предлагаемом в настоящем изобретении, два полипептида Fc могут взаимодействовать, при этом первый полипептид Fc может содержать сконструированную полость в его константном CH3-домене, а второй полипептид Fc может содержать сконструированную выпуклость в его константном CH3-домене.

В других вариантах осуществления изобретения сконструированную полость или сконструированную выпуклость в одном константном CH3-домене можно создавать для лучшего размещения исходной аминокислоты в другом константном CH3-домене.

Согласно настоящему изобретению для усиления формирования димера можно применять также создание дисульфидной связи между CH3-доменами. Например, аминокислоту, отличную от цистеина, в одном константном CH3-домене можно заменять на аминокислоту цистеин для обеспечения образования дисульфидной связи с цистеином другого полипептида Fc, более конкретно, с константным CH3-доменом полипептида Fc.

Кроме того, для усиления формирования димера можно использовать включение одного или нескольких пептидных линкеров. Указанный пептидный линкер, как правило, содержит гибкие аминокислоты, такие как глицин и/или серин. Тем самым первый полипептид Fc можно соединять со вторым полипептидом Fc с помощью пептидного линкера, при этом N-конец пептидного линкера может соединяться с С-концом первого полипептида Fc с помощью химической связи, а С-конец пептидного линкера может соединяться с N-концом второго полипептида Fc с помощью химической связи. Приемлемые пептидные линкеры хорошо известны специалисту в данной области.

Кроме того, два полипептида Fc можно соединять глициновым линкером, т.е. две части полипептида Fc можно соединять через аминокислотную цепь двух или большего количества молекул глицина.

Если полипептид Fc содержит одно или несколько изменений, то они могут находиться в любом положении в молекуле.

Fc-участок, предлагаемый в настоящем изобретении, как правило, собирают из двух полипептидов Fc. В частности, Fc-участок, предлагаемый в настоящем изобретении, может не рассматриваться в качестве полного антитела.

Fc-участок может состоять из двух 2 идентичных полипептидов Fc. Кроме того, Fc-участок может состоять из двух отличных друг от друга полипептидов Fc.

В Fc-участке оба полипептида Fc могут содержать описанные выше мутации или оба полипептида Fc могут относиться к дикому типу, или один полипептид Fc может содержать описанные выше мутации, а другой полипептид Fc может относиться к дикому типу.

В Fc-участке полипептиды Fc могут взаимодействовать посредством любого типа межмолекулярной или внутримолекулярной силы, известного специалисту в данной области, такого как ковалентное или нековалентное связывание. Полипептиды Fc могут взаимодействовать, например, посредством аминокислот с противоположными зарядами, которые можно интродуцировать в их аминокислотную последовательность с помощью описанный выше аминокислотной замены. Кроме того, полипептиды Fc могут взаимодействовать через дисульфидные связи, образовавшиеся в результате соединения двух тиоловых групп двух остатков цистеина различных полипептидов Fc. Кроме

того, полипептиды Fc можно соединять через описанный выше пептидный линкер.

В частности, мультимер Fc состоит из 2-10 Fc-участков, более конкретно мультимер Fc состоит из 3-6 Fc-участков и наиболее предпочтительно мультимер Fc состоит из 3 Fc-участков.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мультимер Fc состоит из 3-6 Fc-участков.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения мультимер Fc состоит из 3 Fc-участков.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc содержит четыре полипептида, которые образуют три Fc-участка, где первый полипептид содержит первый полипептид Fc, первый линкер и второй полипептид Fc, где второй полипептид содержит третий полипептид Fc, второй линкер и четвертый полипептид Fc, где третий полипептид содержит пятый полипептид Fc, где четвертый полипептид содержит шестой полипептид Fc, при этом первый полипептид Fc и третий полипептид Fc образуют первый Fc-участок, пятый полипептид Fc и второй полипептид Fc образуют второй Fc-участок, а шестой полипептид Fc и четвертый полипептид Fc образуют третий Fc-участок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc не содержит распознающую антиген область, например, вариабельный домен (например, V_H, V_L, гипервариабельный участок (HVR)) или определяющий комплементарность участок (CDR).

В некоторых вариантах осуществления этого объекта изобретения каждый из первого и третьего полипептидов Fc включает комплементарные модули селективности димеризации, которые усиливают димеризацию между первым полипептидом Fc и третьим полипептидом Fc; и/или каждый из второго и пятого полипептидов Fc включает комплементарные модули селективности димеризации, которые усиливают димеризацию между вторым полипептидом Fc и пятым полипептидом Fc; и/или каждый из четвертого и шестого полипептидов Fc включает комплементарные модули селективности димеризации, которые усиливают димеризацию между четвертым полипептидом Fc и шестым полипептидом Fc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные комплементарные модули селективности димеризации усиливают селективную димеризацию полипептидов Fc. В любых указанных в настоящем описании конструкциях Fc полипептиды Fc могут иметь различные последовательности, например, последовательности, которые отличаются не более чем 20 аминокислотами (например, не более чем 15, 10 аминокислотами), например, не более чем 20, 15, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотами между двумя полипептидами Fc (т.е. между полипептидом Fc и другим пептидом Fc в конструкции Fc). Например, последовательности полипептидов Fc в конструкции, указанной в настоящем описании, могут быть различными, поскольку комплементарные модули селективности димеризации любой из конструкций Fc могут включать сконструированную полость в константном C_H3-домене антитела одного из полипептидов Fc и сконструированную выпуклость в константном C_H3-домене антитела другого полипептида Fc, в которых сконструированная полость и сконструированная выпуклость расположены таким образом, чтобы образовывать пару выпуклость-в-полость полипептидов Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкции Fc включают аминокислотные модификации в C_H3-домене. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкции Fc включают аминокислотные модификации в C_H3-домене полипептидов Fc (одного или нескольких полипептидов Fc) для селективной димеризация. Примеры сконструированных полостей и выпуклостей известны в данной области. В других вариантах осуществления изобретения комплементарные модули селективности димеризации включают сконструированную (замененную) отрицательно заряженную аминокислоту в константном C_H3-домене антитела одного из полипептидов Fc и сконструированную (замененную) положительно заряженную аминокислоту в константном C_H3-домене антитела другого полипептида Fc, в которых отрицательно заряженная аминокислота и положительно заряженная аминокислота расположены таким образом, чтобы усиливать образование Fc-домена между комплементарными полипептидами Fc. Примеры комплементарных аминокислотных изменений известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько из полипептидов Fc имеют одинаковую последовательность. В некоторых

вариантах осуществления изобретения один или несколько из полипептидов Fc имеют одинаковые модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения только один, два, три или четыре из полипептидов Fc имеют одинаковые модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc включает по меньшей мере два мономера Fc, соединенных через линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc включает по меньшей мере один линкер. Линкер может представлять собой аминокислотный спейсер, включающий 3-200 аминокислот (например, 3-150, 3-100, 3-60, 3-50, 3-40, 3-30, 3-20, 3-10, 3-8, 3-5, 4-30, 5-30, 6-30, 8-30, 10-20, 10-30, 12-30, 14-30, 20-30, 15-25, 15-30, 18-22 и 20-30 аминокислот). Приемлемые пептидные линкеры известны в данной области и включают, например, пептидные линкеры, содержащие остатки гибких аминокислот, таких как глицин и серин. В конкретных вариантах осуществления изобретения линкер может содержать мотивы, например, один мотив, несколько мотивов или повторяющиеся мотивы GS, GGS, GGSG, GGGGS, GGG, GGGG. В конкретных вариантах осуществления изобретения линкер может включать GS, GGS, GGSG, GGGGS, GGG, GGGG или любую из SEQ ID NO: 34-61. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер применяют для соединения двух полипептидов Fc в виде серий тандемов. В других вариантах осуществления изобретения линкер применяют для соединения константных доменов C_L и C_{H1} антитела. В других вариантах осуществления изобретения линкер может содержать также аминокислоты, отличные от глицина и серина.

В некоторых указанных в описании вариантах осуществления изобретения мультимер Fc может содержать полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1-31 или SEQ ID NO: 1-31, в которых присутствуют вплоть до 10 (например, вплоть до 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) модификаций индивидуальных аминокислот (например, замен, например, консервативных замен). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды Fc Fc-домена конструкции могут иметь различные последовательности, например, последовательности, которые отличаются не более чем 20 аминокислотами (например, не более чем 15, 10 аминокислотами), например, не более чем 20, 15, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотами, между

двумя полипептидами Fc (т.е. между полипептидом Fc и другим полипептидом Fc конструкции Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько полипептидов в конструкции Fc содержит концевой остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько полипептидов Fc в конструкции Fc не содержат концевой остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления изобретения все полипептиды Fc в конструкции Fc содержат концевой остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления изобретения все полипептиды Fc в конструкции Fc не содержат концевой остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления изобретения концевой остаток лизина в полипептиде Fc, который содержит, состоит или практически состоит из последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 2, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21, можно удалять для создания соответствующего полипептида Fc, который не содержит концевой остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления изобретения концевой остаток лизина можно добавлять к полипептиду Fc, который содержит, состоит или практически состоит из последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 и 22-31, для создания соответствующего полипептида Fc, содержащего концевой остаток лизина.

В одном из вариантов осуществления изобретения мультимер Fc, предлагаемый в настоящем изобретении, описан в WO 2015/168643 A2, WO 2017/205436 A1, WO 2017/205434 A1 и WO 2018/129255 A1, которые в полном объеме включены в настоящее описании в качестве ссылки. Предпочтительно мультимер Fc содержит 2-10 Fc-доменов, например, представляет собой конструкцию Fc, имеющую 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 Fc-доменов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc содержит три Fc-домена.

Одним из объектов изобретения, представленных в описании, является конструкция Fc, включающая четыре полипептида, которые образуют три Fc-домена. Первый полипептид имеет формулу A-L-B, в которой A включает первый полипептид Fc; L обозначает линкер; и B включает второй полипептид Fc. Второй полипептид имеет формулу A'-L'-B', в которой A' включает третий полипептид Fc; L' обозначает линкер; и B' включает четвертый полипептид Fc.

Третий полипептид включает пятый полипептид Fc и четвертый полипептид включает шестой полипептид Fc. В указанном объекте изобретения A и A' объединены с образованием первого Fc-домена, B и пятый полипептид Fc объединены с образованием второго Fc-домена и B' и шестой полипептид Fc объединены с образованием третьего Fc-домена.

В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения A и A' каждый включает модуль селективности димеризации, который усиливает димеризацию между этими полипептидами Fc. В других вариантах осуществления изобретения B и пятый полипептид Fc каждый включает модуль селективности димеризации, который усиливает димеризацию между этими полипептидами Fc. В следующих вариантах осуществления изобретения B' и шестой полипептид Fc каждый включает модуль селективности димеризации, который усиливает димеризацию между этими полипептидами Fc.

В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения один или несколько из A, B, A', B', третьего полипептида и четвертого полипептида состоит из полипептида Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения A, B, A', B', третий полипептид и четвертый полипептид каждый состоит из полипептида Fc.

В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения B и B' каждый включает мутации D399K и K409D, A и A' каждый включает мутации S354C, T366W и E357K и пятый и шестой полипептиды Fc каждый включает мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V и K370D. Во всем документе нумерация IgG соответствует системе EU-нумерации Кэбота, которая хорошо известна специалисту в данной области.

В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения A и A' каждый включает мутации D399K и K409D, B и B' каждый включает мутации S354C, T366W и E357K и пятый и шестой полипептиды Fc каждый включает мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V и K370D.

В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения L и L' каждый включает по меньшей мере 4, 8, 12, 14, 16, 18 или 20 глицинов. В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения L и L' каждый включает 4-30, 8-30 или 12-30 глицинов. В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения L и L' каждый содержит,

состоит или практически состоит из GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 61).

В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция Fc дополнительно включает гетерологичный фрагмент, например, пептид, например, связывающий альбумин пептид, соединенный с N-концом или C-концом B или B', например, с помощью линкера.

В других вариантах осуществления изобретения первый и второй полипептиды конструкции Fc имеют одинаковую аминокислотную последовательность, и третий и четвертый полипептиды конструкции Fc имеют одинаковую аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй полипептиды содержат, состоят или практически состоят из последовательности SEQ ID NO: 24, а третий и четвертый полипептиды содержат, состоят или практически состоят из последовательности SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй полипептиды содержат, состоят или практически состоят из последовательности SEQ ID NO: 24, а третий и четвертый полипептиды содержат, состоят или практически состоят из последовательности SEQ ID NO: 23 с заменой в положении 162 Glu на Asp. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc в композиции содержит два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc в композиции содержит два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 с заменой в положении 162 Glu на Asp, и два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимер Fc в композиции содержит два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, в которой примерно 12% полипептидов имеют замену Glu на Asp в положении 162. В некоторых вариантах осуществления, представленных в описании, первый и второй полипептид каждый содержит, состоит или практически состоит из SEQ ID NO: 24, в которой присутствуют вплоть до 10 (например, вплоть до 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) модификаций индивидуальных

аминокислот (например, замен, например, консервативных замен), и третий и четвертый полипептиды содержат, состоят или практически состоят из последовательности SEQ ID NO: 23, в которой присутствуют вплоть до 10 (например, вплоть до 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) модификаций индивидуальных аминокислот (например, замен, например, консервативных замен). В некоторых случаях первый и второй полипептиды содержат, состоят или практически состоят из SEQ ID NO: 29, в третий и четвертый полипептиды содержат, состоят или практически состоят из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, представленных в описании, первый и второй полипептид каждый содержит, состоит или практически состоит из SEQ ID NO: 29, в которой присутствуют вплоть до 10 (например, вплоть до 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) модификаций индивидуальных аминокислот (например, замен, например, консервативных замен), и третий и четвертый полипептиды содержат, состоят или практически состоят из SEQ ID NO: 28, в которой присутствуют вплоть до 10 (например, вплоть до 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) модификаций индивидуальных аминокислот (например, замен, например, консервативных замен).

В некоторых вариантах осуществления указанного объекта изобретения, представленных в описании, первый и третий полипептид Fc каждый включает комплементарный модуль селективности димеризации, который усиливает димеризацию между первым полипептидом Fc и третьим полипептидом Fc, и второй и четвертый полипептид Fc каждый включает комплементарный модуль селективности димеризации, который усиливает димеризацию между вторым полипептидом Fc и четвертым полипептидом Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения комплементарный модуль селективности димеризации в каждом из первого и второго полипептидов Fc включает сконструированную выпуклость, а комплементарный модуль селективности димеризации в каждом из третьего и четвертого полипептидов Fc включает сконструированную полость.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько мономеров Fc-домена включает шарнирную область IgG или ее часть, константный домен C_H2 антитела IgG-класса и константный домен C_H3 антитела IgG-класса. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из полипептидов Fc включает шарнирную область IgG или ее часть, константный

домен C_H2 антитела IgG-класса и константный домен C_H3 антитела IgG-класса. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из полипептидов Fc представляет собой полипептид Fc IgG1, предпочтительно полипептид Fc человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления двух предыдущих объектов изобретения, представленных в описании, N-концевой Asp в одном или нескольких из первого, второго, третьего и четвертого полипептидов заменен в результате мутации на Gln. В некоторых вариантах осуществления изобретения N-концевой Asp в каждом из первого, второго, третьего и четвертого полипептидов заменен в результате мутации на Gln.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в одном или нескольких из первого, второго, третьего и четвертого полипептидов отсутствует C-концевой лизин. В некоторых вариантах осуществления изобретения в каждом из первого, второго, третьего и четвертого полипептидов отсутствует C-концевой лизин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый полипептид и второй полипептид имеют одинаковую аминокислотную последовательность, и третий полипептид и четвертый полипептид имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый полипептид и второй полипептид имеют разную аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий полипептид и четвертый полипептид имеют разную аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из Fc-доменов включает аминокислотную модификацию, которая изменяет одну или несколько из следующих характеристик: (I) аффинность связывания с одним или несколькими Fc-рецепторами, (II) эффекторые функции, (III) уровень сульфатации Fc-домена, (IV) время полужизни, (V) устойчивость к протеазам, (VI) стабильность Fc-домена и/или (VII) чувствительность к расщеплению. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен включает аминокислотную модификацию, которая изменяет аффиность связывания с одним или несколькими Fc-рецепторами, например, S267E/L328F. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой FcγRIIb.

В некоторых случаях указанная в настоящем описании модификация повышает аффинность к FcγRIIb-рецептору. В некоторых случаях модификация S267E/L328F повышает аффинность связывания с FcγRIIb. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен включает аминокислотную модификацию, которая изменяет уровень сульфатации Fc-домена, например, 241F, 243F, 246K, 260T или 301R. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен включает аминокислотную модификацию, которая изменяет устойчивость к протеазам, например, выбранную из следующих наборов: 233P, 234V, 235A и 236del; 237A, 239D и 332E; 237D, 239D и 332E; 237P, 239D и 332E; 237Q, 239D и 332E; 237S, 239D и 332E; 239D, 268F, 324T и 332E; 239D, 326A и 333A; 239D и 332E; 243L, 292P и 300L; 267E, 268F, 324T и 332E; 267E и 332E; 268F, 324T и 332E; 326A, 332E и 333A; или 326A и 333A. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен включает аминокислотную модификацию, которая изменяет чувствительность Fc-домена к расщеплению, например, C233X, D234X, K235X, S236X, T236X, H237X, C239X, S241X и G249X, где X обозначает любую аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения объектом является Fc-конструкция, включающая а) первый полипептид, который включает I) первый полипептид Fc; II) второй полипептид Fc; и III) линкер, соединяющий первый полипептид Fc со вторым полипептидом Fc; б) второй полипептид, который включает I) третий полипептид Fc; II) четвертый полипептид Fc; и III) линкер, соединяющий третий полипептид Fc с четвертым полипептидом Fc; в) третий полипептид, который включает пятый полипептид Fc; и г) четвертый полипептид, который включает шестой полипептид Fc; в которой первый полипептид Fc и пятый полипептид Fc объединены с образованием первого Fc-домена, второй полипептид Fc и четвертый полипептид Fc объединены с образованием второго Fc-домена, и третий полипептид Fc и шестой полипептид Fc объединены с образованием третьего Fc-домена, и в которой по меньшей мере один Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении I253 (например, модификацию единичной аминокислоты в положении I253).

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй полипептиды идентичны друг другу и третий и четвертый полипептиды идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления изобретения

первый Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении I253. В некоторых случаях один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену в положении I253. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении I253. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену в положении I253. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении I253. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену в положении I253. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждую аминокислотную модификацию (например, замену) в положении I253 независимо выбирают из группы, состоящей из I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W и I253Y. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая аминокислотная модификация (например, замена) в положении I253 представляет собой I253A.

В другом объекте изобретения описание содержит Fc-конструкцию, включающую а) первый полипептид, который включает I) первый полипептид Fc; II) второй полипептид Fc; и III) линкер, соединяющий первый полипептид Fc со вторым полипептидом Fc; б) второй полипептид, который включает I) третий полипептид Fc; II) четвертый полипептид Fc; и III) линкер, соединяющий третий полипептид Fc с четвертым полипептидом Fc; в) третий полипептид, который включает пятый полипептид Fc; и г) четвертый полипептид, который включает шестой полипептид Fc; в которой первый полипептид Fc и пятый полипептид Fc объединены с образованием первого Fc-домена, второй полипептид Fc и четвертый полипептид Fc объединены с образованием второго Fc-домена, и третий полипептид Fc и шестой полипептид Fc объединены с образованием третьего Fc-домена, и в которой по меньшей мере один Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении R292 (например, модификацию единичной аминокислоты).

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении R292. В некоторых

случаях один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену в положении R292. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении R292. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену в положении R292. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий Fc-домен включает аминокислотную модификацию в положении R292. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену в положении R292. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из первого, второго и третьего Fc-доменов включает аминокислотную модификацию (например, замену) в положении R292. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из первого, второго и третьего Fc-доменов включает аминокислотную модификацию (например, замену) R292P (т.е. каждый мономер Fc имеет модификацию R292P, например, по сравнению с SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P, один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P, и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждую аминокислотную модификацию (например, замену) в положении R292 независимо выбирают из R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T или R292Y. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая аминокислотная модификация (например, замена) в положении R292 представляет собой R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную модификацию (например, замену) I253A, и первый, второй и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную модификацию (например, замену) R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену I253A, один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену I253A, один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба включают

аминокислотную замену R292P, один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P, и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый, второй и третий Fc-домен каждый включает аминокислотные модификации (например, замены) I253A и R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену I253A, один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену I253A, и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену I253A, один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P, один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P, и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба включают аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотные замены I253A и R292P, и второй Fc-домен включает аминокислотную замену R292P. В некоторых случаях один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; и один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения второй Fc-домен включает аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения один и первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A, и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах

осуществления изобретения первый Fc-домен, второй Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A, один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A, и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения второй Fc-домен включает аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй Fc-домен включает аминокислотные замены I253A и R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A, и один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную замену I253A, и второй Fc-домен включает аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; и один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную замену I253A, и второй Fc-домен включает аминокислотные замены I253A и R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; и один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает

аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P, и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc- домен включают аминокислотную замену R292P, и второй Fc-домен включает аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; и один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает I253A и R292P (например, включает аминокислотные замены I253A и R292P). В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотные замены I253A и R292P, и второй Fc-домен включает аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; и один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен, второй Fc- домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и

пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотную замену R292P, и второй Fc-домен включает аминокислотные замены I253A и R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; и один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый Fc-домен, второй Fc-домен и третий Fc-домен каждый включает аминокислотные замены I253A и R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один их первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену I253A; один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P; один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную заменуу I253A; и один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый, второй и третий Fc-домены каждый включает аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из первого и пятого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из третьего и шестого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из второго и четвертого полипептидов Fc или они оба содержат аминокислотную замену R292P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкции Fc, указанные в настоящем описании, не включают распознающую антиген область, например, вариабельный домен или определяющий комплементарность участок (CDR). В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция Fc (или Fc-домен в конструкции Fc) создают полностью или частично путем ассоциации полипептидов Fc, присутствующих в различных полипептидах. В конкретных вариантах осуществления изобретения конструкция Fc не включает дополнительный домен (например, хвостовую часть IgM или хвостовую часть IgA), который усиливает ассоциацию двух полипептидов. В других вариантах осуществления изобретения ковалентные связи (например, дисульфидные мостики) присутствуют только между двумя полипептидами Fc, которые объединяют для создания Fc-домена. В других вариантах осуществления изобретения конструкция Fc не включает ковалентные связи (например, дисульфидые мостики) между Fc-доменами. В следующих вариантах осуществления изобретения конструкция Fc обеспечивает достаточную структурную гибкость, в результате чего все или практически все Fc-домены в конструкции Fc обладают способностью одновременно взаимодействовать с Fc-рецептором на клеточной поверхности. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептиды Fc по первичной последовательности отличаются от дикого типа или друг от друга тем, что они имеют модули селективности димеризации.

В другом объекте изобретения описание включает композиции и способы для усиления селективной димеризации полипептидов Fc. Описание включает Fc-домен, в котором два полипептида Fc Fc-домена включают идентичные мутации по меньшей мере в двух положениях внутри кольца заряженных остатков на границе раздела между константными C_H3-доменами антитела. Описание включает также способ получения указанного Fc-домена, который включает интродукцию комплементарных модулей селективности димеризации, имеющих идентичные мутации в последовательностях двух полипептидов Fc по меньшей мере в двух положениях внутри кольца заряженных остатков на границе раздела между константными C_H3-доменами антитела. Граница раздела между константными C_H3-доменами антител состоит из гидрофобных очагов, окруженных кольцом заряженных остатков. Когда один константный C_H3-домен

антитела соединяется с другим, то указанные заряженные остатки спариваются с остатками противоположного заряда. В результате изменения заряда обоих компонентов двух или большего количества комплементарных пар остатков мутантные полипептиды Fc остаются комплементарными полипептидам Fc, имеющим такую же мутантную последовательность, но обладают меньшей комплементарностью относительно полипептидов Fc без указанных мутаций. В указанном варианте осуществления изобретения идентичные модули селективности димеризации усиливают гомодимеризацию. Указанные Fc-домены включают полипептиды Fc, содержащие двойные мутанты K409D/D399K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D399K, K392E/D399K, E357K/K370D или D356K/K439E. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен включает полипептиды Fc, включающие четверные мутанты, в которые объединены любые пары двойных мутантов, например, K409D/D399K/E357K/K370E.

В другом варианте осуществления изобретения в дополнение к идентичным модулям селективности димеризации полипептиды Fc Fc-домена включают комплементарные модули селективности димеризации, имеющие неидентичные мутации, которые усиливают специфическую ассоциацию (например, сконструированные полость и выпуклость). В результате два полипептида Fc включают два модуля селективности димеризации и сохраняют комплементарность относительно друг друга, но имеют пониженную комплементарность относительно других полипептидов Fc. Указанный вариант усиливает гетеродимеризацию между содержащим полость полипептидом Fc и содержащим выпуклость полипептидом Fc. В одном примере комплементарные модули селективности димеризации, имеющие неидентичные мутации в заряженных парах остатков в обоих полипептидах Fc, объединяют с помощью выпуклости на одном полипептиде Fc и полости в другом полипептиде Fc. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды Fc Fc- домена включают комплементарные модули селективности димеризации, имеющие неидентичные мутации, которые усиливают специфическую ассоциацию (например, сконструированные полость и выпуклость), и не включают идентичные модули селективности димеризации.

Очевидно, что в любой из указанных в настоящем описании конструкций Fc порядок полипептидов Fc является взаимозаменяемым. Например, в полипептиде, имеющим формулу A-L-B, карбоксильный конец A может быть соединен с аминоконцом L, который в свою очередь объединен на его карбоксильном конце с аминоконцом B. Альтернативно этому, карбоксильный конец B может быть соединен с аминоконцом L, который в свою очередь объединен на его карбоксильном конце с аминоконцом C. Обе указанные конфигурации описываются формулой A-L-B.

Свойства указанных конструкций позволяют эффективно создавать практически гомогенные композиции. Степень гомогенности композиции влияет на фармакокинетику и активность композиции *in vivo*. Указанная гомогенность композиции требуется для того, чтобы гарантировать безопасность, эффективность, однородность и надежность композиции. Конструкция Fc, указанная в описании, может нкаходиться в популяции или композиции, которая является практически гомогенной (например, гомогенной по меньшей на 85%, 90%, 95%, 98% или 99%).

Как более подробно будет описано ниже, в настоящем описании представлены практически гомогенные композиции, содержащие конструкции Fc, которые все имеют одинаковое количество Fc-доменов, а также способы получения указанных практически гомогенных композиций.

Конструкция Fc, представленная в описании, может находиться в фармацевтической композиции, которая включает практически гомогенную популяцию (например, гомогенную по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) конструкций Fc, имеющих 2-10 Fc-доменов (например, 2-8 Fc-доменов, 2-6 Fc-доменов, 2-4 Fc-домена, 2-3 Fc-домена, 3-5 Fc-доменов или 5-10 Fc-доменов), например, конструкций, имеющих 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 Fc-доменов, например, указанной в настоящем описании. Таким образом, можно получать фармацевтические композиции, в которых отсутствует существенная агрегация или нежелательная мультимеризация конструкций Fc.

Кроме того, мультимер Fc может состоять из 6 Fc-участков, где эти Fc-участки представляют собой Fc-участки IgG и в результате добавления C-концевого состоящего из 18 аминокислот хвостового участка IgM приводит к гексамеризации IgG. Предпочтительные примеры указанных гексамеров

описаны в WO 2017/129737 A1. Например, мультимер Fc содержит шесть Fc-доменов IgG. Каждый из Fc-доменов IgG содержит два полипептида Fc и каждый полипептид Fc содержит полипептид Fc IgG и хвостовой участок IgM.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид Fc дополнительно содержит шарнирную область IgG и полипептид Fc не содержит полипептид Fab.

Например, в одном из вариантов осуществления изобретения полипептид Fc содержит шарнирную область IgG1, Fc-область IgG1 и хвостовую область IgM и не содержит полипептид Fab. В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид Fc имеет SEQ ID NO: 32 и имеет вплоть до 5 консервативных аминокислотных замен.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид Fc содержит шарнирную область IgG1, Fc-область IgG1 и хвостовую область IgM, в котором в Fc-области IgG1 присутствует цистеин вместо лейцина в положении 309 (в соответствии с EU-нумерацией) и в котором полипептид Fc не содержит полипептид Fab, и полипептид Fc имеет SEQ ID NO: 33. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид Fc имеет SEQ ID NO: 33, содержащую вплоть до 5 консервативных аминокислотных замен.

В целом, мультимер Fc может состоять из идентичных Fc-участков. Кроме того, мультимер Fc может состоять из Fc-участков, которые все отличаются друг от друга или которые частично идентичны и частично отличаются друг от друга в любой комбинации.

В мультимере Fc все Fc-участки могут иметь мутации или ни один из Fc-участков может не содержать мутации ,или любое количество Fc-участков могут иметь мутации. В частности, подразумевается, что Fc-участок, предлагаемый в настоящем изобретении, может не представлять собой полное антитело.

Полипептид Fc, Fc-участок или мультимер Fc можно получать с помощью любого процесса получения антител, получения Fc-участков или получения белков, известных специалисту в данной области. Методы получения полипептидов Fc, Fc-участков и мультимеров Fc, как правило, хорошо известны специалисту в данной области. Например, полипептид Fc, Fc-участок или мультимер Fc можно получать с использованием клетки млекопитающего, клетки бактерии или клетки насекомого путем интродукции нуклеиновой

кислоты, которая кодирует белок в клетке млекопитающего, клетке бактерии или клетке насекомого. Затем полипептид Fc, Fc-участок или мультимер Fc можно выделять из клетки млекопитающего, клетки бактерии или клетки насекомого, или из супернатанта.

Композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит мультимер Fc в концентрации от 60 мг/мл до 180 мг/мл.

Композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, в частности, содержит мультимер Fc в концентрации от 70 мг/мл до 160 мг/мл, более конкретно в концентрации от 80 мг/мл до 120 мг/мл, еще более предпочтительно в концентрации от 90 мг/мл до 110 мг/мл и наиболее предпочтительно в концентрации от 95 мг/мл до 105 мг/мл.

Кроме того, композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, в частности, содержит мультимер Fc в концентрации от 70 мг/мл до 160 мг/мл, более конкретно в концентрации от 70 мг/мл до 140 мг/мл, еще более предпочтительно в концентрации от 70 мг/мл до 120 мг/мл и наиболее предпочтительно в концентрации от 70 мг/мл до 110 мг/мл.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит мультимер Fc в концентрации от 70 мг/мл до 110 мг/мл.

Кроме того, композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, в частности, содержит мультимер Fc в концентрации от 90 мг/мл до 180 мг/мл, более конкретно в концентрации от 110 мг/мл до 180 мг/мл, еще более предпочтительно в концентрации от 115 мг/мл до 160 мг/мл и наиболее предпочтительно в концентрации от 120 мг/мл до 160 мг/мл.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит мультимер Fc в концентрации от 110 мг/мл до 180 мг/мл, в частности, 120 мг/мл или 160 мг/мл.

Концентрацию белка в композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, можно измерять с помощью пригодных методик, известных специалисту в данной области. Например, концентрацию белка в композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, можно измерять с помощью абсорбционной спектроскопии, колориметрии (такой как

тест Брэтфорда, биуретовый анализ, анализ бицинхониновой кислоты (BCA-анализ) или анализ Лоури), гравиметрического анализа (например, анализа Кьельдаля), количественного анализа аминокислот (такого как общий гидролиз, анализ конечных групп и расщепление по Эдману), или с помощью рефрактометрии. Предпочтительно в композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, для измерения концентрации белка применяли УФ-спектроскопию, измеряя абсорбцию при 280 нм.

Композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, имеет также значение pH от 4,8 до 6,0.

В частности, композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, имеет значение pH от 4,9 до 5,8, более конкретно композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, имеет значение pH от 5,0 до 5,6 и наиболее предпочтительно композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, имеет значение pH от 5,0 до 5,5.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, имеет значение pH от 5,0 до 5,5.

Значение pH композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, можно определять с помощью любой методики измерения значения pH, известной специалисту в данной области, такой как применение pH-метра.

Композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит также стабилизатор в концентрации от 200мМ до 450мМ.

Понятие «стабилизатор» согласно настоящему изобретению может относиться к любой субстанции, которая препятствует расщеплению любого компонента в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. В частности, стабилизатор представляет собой субстанцию, предупреждающую расщепление и/или агрегацию мультимера Fc и/или Fc-участка в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении.

Приемлемые стабилизаторы хорошо известны специалисту в данной области. Например, приемлемый стабилизатор может представлять собой любой антиоксидант (например, для предупреждения аутоокисления), любой секвестрант (например, для инактивации ионов металлов, которые могут

действовать в качестве катализаторов) или любой ультрафиолетовый стабилизатор (УФ-поглотитель) (например, для предупреждения расщепления из-за ультрафиолетового излучения).

В частности, стабилизатор, применяемый согласно настоящему изобретению, может представлять собой полиол и/или аминокислоту.

Полиол, применяемый в качестве стабилизатора в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может представлять собой органическую молекулу на основе от 2 до 20 атомов углерода, в частности, от 3 до 18 атомов углерода, более конкретно от 4 до 15 атомов углерода, наиболее предпочтительно от 5 до 12 атомов углерода. Кроме того, полиол может быть линейным или разветвленным. Кроме того, полиол может представлять собой кольцевую молекулу, содержащую один, два или большее количество колец. Полиол может содержать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 гидроксильных групп. Полиол может также быть алифатическим, циклоалифатическим или ароматическим.

Приемлемые полиолы, применяемые в качестве стабилизатора в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, хорошо известны специалисту в данной области, и могут представлять собой дисахарид, глицерин, маннит, инозит, ксилит, эритрит и/или адонит. Более конкретно, стабилизатор представляет собой дисахарид, такой как сахароза или трегалоза, и/или сорбит.

Приемлемые аминокислоты, применяемые в качестве стабилизатора в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, хорошо известны специалисту в данной области. В частности, встречающиеся в естественных условиях аминокислоты, такие как аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и/или валин, можно применять в качестве стабилизатора в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Более конкретно, пролин или аргинин можно применять в качестве стабилизатора в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит в качестве

стабилизатора полиол, в частности, дисахарид, предпочтительно сахарозу или трегалозу, или восстановленные сахариды, такие как сорбит.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать один стабилизатор или может содержать смесь из 2, 3, 4, 5 или большего количества стабилизаторов.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать стабилизатор в концентрации от 50мМ до 500мМ, в частности, стабилизатор в концентрации от 100мМ до 400мМ, более конкретно стабилизатор в концентрации от 200мМ до 300мМ, наиболее предпочтительно стабилизатор в концентрации от 225мМ до 275мМ.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать сахарозу в концентрации по меньшей мере 200мМ, в частности, сахарозу в концентрации от 200мМ до 1000мМ, более конкретно сахарозу в концентрации от 200мМ до 750мМ и наиболее предпочтительно сахарозу в концентрации от 220мМ до 500мМ. Если сахарозу применяют в комбинации с одним или несколькими другими стабилизаторами, то можно применять сахарозу в более низких концентрациях, например, сахарозу в концентрации по меньшей мере 100мМ или сахарозу в концентрации от 100мМ до 250мМ.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать трегалозу в концентрации от 100мМ до 500мМ, в частности, трегалозу в концентрации от 150мМ до 400мМ, более конкретно трегалозу в концентрации от 200мМ до 300мМ.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать сорбит в концентрации от 50мМ до 500мМ, в частности, сорбит в концентрации от 100мМ до 400мМ, более конкретно сорбит в концентрации от 200мМ до 300мМ, наиболее предпочтительно сорбит в концентрации от 225мМ до 275мМ.

В композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, молярное соотношении мультимера Fc и стабилизатора может составлять от 1:100 до 1:800, в частности, от 1:300 до 1:650, более конкретно от 1:350 до 1:500 и наиболее предпочтительно от 1:400 до 1:425.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения в композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, молярное соотношение мультимера Fc и стабилизатора составляет от 1:300 до 1:650, в частности, от

1:400 до 1:425. Предпочтительно согласно указанному варианту осуществления изобретения композиция мультимера Fc содержит менее 10%, более предпочтительно менее 7%, еще более предпочтительно менее 5%, наиболее предпочтительно менее 3,5% агрегатов (определенных с помощью SEC) при хранении в течение 12 месяцев при 2-8°C. Предпочтительно согласно указанному варианту осуществления изобретения композиция мультимера Fc содержит менее 15%, более предпочтительно менее 10%, еще более предпочтительно менее 8%, наиболее предпочтительно менее 6,5 % агрегатов при хранении при 25°C.

Кроме того, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать буфер или может не содержать буфер.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в изобретении, содержит буфер.

Понятие «буфер» согласно настоящему изобретении означает смесь слабой кислоты и ее сопряженного основания или наоборот, в буферном диапазоне, который поддерживает практически постоянное значение pH при добавлении дополнительных кислот или оснований.

Композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать один или несколько буферов. Буферы, приемлемые согласно настоящему изобретению, хорошо известны в данной области. Как правило, можно использовать любой буфер, пригодный для фармацевтических применений, в частности, пригодный для введения в организм индивидуума, такого как больной человек. Примеры буферов, приемлемых для диапазона pH, требуемого согласно настоящему изобретению, включают фосфатный буфер, глутаматный буфер, ацетатный буфер, гистидиновый буфер и/или цитратный буфер. В частности, буфер представляет собой ацетатный буфер, гистидиновый буфер или цитратный буфер.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит буфер, при этом буфер представляет собой ацетатный буфер, гистидиновый буфер или цитратный буфер. В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит гистидиновый буфер.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может дополнительно содержать антиоксидант. Понятие «антиоксидант» согласно настоящему изобретению относится к субстанции, ингибирующей окисление. Предпочтительно антиоксидант ингибирует окисление мультимера Fc или Fc-участка, или полипептида Fc мультимера Fc в композиции. Приемлемые антиоксиданты хорошо известны специалисту в данной области. Например, можно использовать любой антиоксидант, пригодный для фармацевтических применений, в частности, пригодный для введения в организм индивидуума, такого как больной человек. Композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать один или несколько антиоксидантов.

Примерами пригодных антиоксидантов являются аскорбиновая кислота, витамин Е, восстановленный глутатион (GSH) и/или метионин. В частности, композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать метионин.

Приемлемые количества антиоксиданта, которые можно применять согласно настоящему изобретению, хорошо известны специалисту в данной области и могут зависеть также от типа антиоксиданта. Как правило, композиция мультимера Fc может содержать антиоксидант в концентрации от 0,01мМ до 100мМ, в частности, антиоксидант в концентрации от 0,05мМ до 50мМ, более конкретно антиоксидант в концентрации от 0,1мМ до 30мМ и наиболее предпочтительно антиоксидант в концентрации от 0,5мМ до 25мМ и даже от 1мМ до 20мМ.

В частности, композиция мультимера Fc может содержать метионин в концентрации от 0,01мМ до 100мМ, в частности, метионин в концентрации от 0,05мМ до 20мМ, более конкретно метионин в концентрации от 0,1мМ до 17мМ, еще более предпочтительно метионин в концентрации от 0,5мМ до 15мМ и наиболее предпочтительно метионин в концентрации от 1мМ до 12мМ.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит дополнительно антиоксидант, в частности, метионин.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать дополнительно поверхностно-активное вещество. Понятие «поверхностно-активное вещество» согласно настоящему изобретению относится к соединению,

которое снижает поверхностное натяжение (или межфазное натяжение) между двумя жидкостями, между газом и жидкостью или между жидкостью и твердым веществом. Таким образом, поверхностно-активное вещество при растворении в воде может уменьшать опережающий угол контакта (соприкосновения), способствуя вытеснению воздушной фазы на поверхность, и заменять ее жидкой фазой.

Поверхностно-активные вещества, которые можно применять в композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, хорошо известны специалисту в данной области. В частности, можно использовать любое поверхностно-активное вещество, пригодное для фармацевтических применений, в частности, пригодное для введения в организм индивидуума, такого как больной человек.

Например, поверхностно-активное вещество может принадлежать к одному из следующих подклассов: анионные, неионные, цвитерионные поверхностно-активные вещества или может принадлежать к подклассу поверхностно-активных веществ, имеющих катионные головные группы.

В частности, можно применять неионное поверхностно-активное вещество. Специалисту в данной области хорошо известны приемлемые неионные поверхностно-активные вещества, такие как простые эфиры полиоксиэтиленгликоля и октилфенола (такие как C_8H_{17}–(C_6H_4)–(O-C_2H_4)$_{1–25}$–OH (например, Triton™ X-100)), сложные алкиловые эфиры сорбитана (например, SPAN® и/или сложные алкиловые эфиры полиоксиэтиленгликоля и сорбитана, такие как полисобрат (например, полисорбат 20 или полисорбат 80)) и/или полоксамеры (например, Antarox®). В частности, используют сложные алкиловые эфиры сорбитана, более конкретно сложный алкиловый эфир полиоксиэтиленгликоля и сорбитана, еще более предпочтительно полисорбат и наиболее предпочтительно полисорбат 80.

Как правило, можно применять также анионные поверхностно-активные вещества. Специалисту в данной области хорошо известны приемлемые анионные поверхностно-активные вещества, такие как диоктилсульфосукцинат натрия (DOSS), сульфат простого лаурилового эфира натрия (например, Texapon®), лигносульфонат и/или стерат натрия.

Как правило, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать одно или несколько поверхностно-активных веществ. Если композиция содержит более одного поверхностно-активного вещества, то они могут принадлежать к одному или к различным подклассам поверхностно-активных веществ. Кроме того, если композиция содержит более одного поверхностно-активного вещества, то они могут представлять собой любую смесь поверхностно-активных веществ, упомянутых выше.

Приемлемые количества поверхностно-активного вещества, которые можно применять согласно настоящему изобретению, хорошо известны специалисту в данной области и могут зависеть также от типа поверхностно-активного вещества. Как правило, композиция может содержать поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,0001% (мас./об.) до 0,5% (мас./об.), в частности, поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,001% (мас./об.) до 0,1% (мас./об.), более конкретно поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,005% (мас./об.) до 0,05% (мас./об.) и наиболее предпочтительно поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,01% (мас./об.) до 0,03% (мас./об.). Например, композиция может содержать полисорбат 80 в концентрации от 0,0001% (мас./об.) до 0,5% (мас./об.), в частности, полисорбат 80 в концентрации от 0,001% (мас./об.) до 0,1% (мас./об.), более конкретно полисорбат 80 в концентрации от 0,005% (мас./об.) до 0,05% (мас./об.) и наиболее предпочтительно полисорбат 80 в концентрации от 0,01% (мас./об.) до 0,03% (мас./об.).

В предпочтительном варианте осуществления композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит дополнительно поверхностно-активное вещество, в частности, полисорбат 80.

Композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать дополнительно общепринятые фармацевтические добавки и адъюванты, эксципиенты или разбавители, включая (но не ограничиваясь только ими) воду, соли, желатин любого происхождения, растительные камеди, лигнинсульфонат, тальк, сахара, крахмал, гуммиарабик, растительные масла, полиалкиленгликоли, корригенты, консерванты, эмульгаторы, замасливатели, красители, смачивающие вещества, наполнители и т.п., например, другие субстанции, которые не вступают в нежелательную реакцию с действующими

веществами. Композиция мультимера Fc композиция может содержать дополнительно ферменты, такие как ингибиторы протеаз.

В частности, композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать дополнительно одну или несколько солей. Приемлемые соли хорошо известны специалисту в данной области, в частности, те, которые пригодны для фармацевтических применений, такие как хлорид натрия. В частности, композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать дополнительно соль в концентрации от 1мМ до 250мМ, более конкретно соль в концентрации от 10мМ до 200мМ, наиболее предпочтительно соль в концентрации от 30мМ до 170мМ.

Необязательно суспензия может содержать также дополнительные приемлемые агенты, которые повышают растворимость соединений, позволяя получать высоко концентрированные растворы.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция мультимера Fc, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать мультимер Fc, в частности CSL730, в количестве 70 мг/мл, L-гистидиновый буфер, хлорид натрия и L-пролин, полисорбат 80 и воду для инъекции.

Композицию мультимера Fc можно стерилизовать или обрабатывать любым путем, известным специалисту в данной области, пригодным для сохранения композиции при хранении.

Вторым объектом изобретения является композиция мультимера Fc, содержащая композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, в лиофилизированной форме.

Все варианты осуществления изобретения, описанные выше касательно композиции мультимера Fc, предлагаемой в первом объекте изобретения, можно применять также касательно второго объекта изобретения.

Понятие «лиофилизация» согласно настоящему изобретению означает любой процесс низкотемпературной дегидратации, включающий замораживание продукта, снижение давления и удаление льда посредством сублимации.

Композицию мультимера Fc можно лиофилизировать с помощью любого метода лиофилизации, известного специалисту в данной области. Лиофилизацию можно осуществлять любыми путями и при любой температуре.

Предпочтительно лиофилизацию осуществляют при комнатной температуре (КТ).

Композицию мультимера Fc можно предварительно обрабатывать перед лиофилизацией, что может включать, например, концентрирование композиции мультимера Fc.

Лиофилизация может включать первую фазу первичной сушки. Во время фазы первичной сушки давление может быть пониженным (в диапазоне нескольких миллибар), и к материалу может быть подано количество тепла, достаточное для сублимации льда. Необходимое количество тепла можно рассчитывать на основе скрытой теплоты сублимации сублимирующих молекул. На указанной начальной фазе сушки из материала может быть сублимировано примерно 95% воды. Указанная фаза может быть медленной (может занимать несколько дней при промышленном производстве), поскольку, если добавлять слишком много тепла, то структура материала может изменяться. На начальной фазе сушки давление можно контролировать, применяя частичный вакуум. Вакуум обычно ускоряет сублимацию, что делает его ценным для замедленного процесса сушки. Кроме того, камера холодного конденсатора и/или пластины конденсатора могут представлять собой поверхность для повторного испарения водяного пара и затвердевания.

Лиофилизация может включать вторую фазу вторичной сушки, при которой температура можно превышать температуру при первичной фазе сушки и может даже превышать 0°C. Как правило, на этой стадии можно также снижать давление для стимулирования дезорбции (как правило, в диапазоне микробаров или долей паскаля). Однако могут существовать продукты, на которые также благоприятно воздействует повышенное давление. После лиофилизации компоненты буфера можно удалять для получения безводных солей.

Кроме того, после процесса лиофилизации материал можно запечатывать, например, в стеклянный флакон. Как правило, полученный порошок можно восстанавливать путем добавления приемлемого растворителя перед использованием. Раствор может представлять собой водный раствор, такой как водный забуференный физиологический раствор.

Предпочтительно лиофилизацию осуществляют до тех пор, пока не происходит удаление (большей части) жидкости. В конце процесса

лиофилизации конечное остаточное содержание воды в продукте, как правило, является чрезвычайно низким. В частности, конечное остаточное содержание воды в продукте составляет от 1% до 4%.

В частности, лиофилизат, указанный в описании, может являться практически чистым и/или стерильным.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения в композиции мультимера Fc в лиофилизированной форме, предлагаемой в настоящем изобретении, мультимер Fc состоит из 3-10 Fc-участков.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения в композиции мультимера Fc в лиофилизированной форме, предлагаемой в настоящем изобретении, мультимер Fc состоит из 3 Fc-участков.

Третьим объектом изобретения является композиция мультимера Fc, предлагаемая в изобретении, предназначенная для применения для лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания.

Понятие «аутоиммунное заболевание» согласно настоящему изобретению означает состояние, возникающее в результате аномального иммунного ответа на нормальный компонент организма и является подтипом воспалительных заболеваний.

Как правило, композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, можно применять для лечения любого аутоиммунного заболевания, известного специалисту в данной области. В частности, композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, можно применять для лечения любого аутоиммунного заболевания, известного специалисту в данной области, которое можно излечивать путем введения Fc-участков или мультимеров Fc. Как правило, композицию мультимера Fc, предлагаемую в изобретении, можно применять для лечения аутоиммунного заболевания в любой части организма.

Примеры аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить с помощью композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, могут включать целиакию, сахарный диабет 1-го типа, болезнь Грейвса, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, псориаз, ревматоидный артрит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), болезнь Кавасаки, синдром Гийена-Барре (GBS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию (CIDP), мультифокальную двигательную

нейропатию (MMN), миастению гравис, язвенный колит, заболевания почек, опосредованные иммунным комплексом, склеродермию, дерматомиозит, оптический нейромиелит, синдром Шегрена, системный васкулит или системную красную волчанку.

Понятие «воспалительное заболевание» согласно настоящему изобретению означает нарушение или состояние, характеризующееся воспалением, т.е. комплексной биологической защитной реакцией клеток и тканей организма на вредные стимулы (такие как патогены, поврежденные клетки или раздражители). В воспалении, как правило, участвуют иммунные клетки, кровеносные сосуды и молекулярные медиаторы.

Примерами воспалительных заболеваний являются астма, хроническая язвенная болезнь, туберкулез, периодонтит, болезнь Крона, гломерулонефрит, отторжение трансплантата, синусит или активный гепатит.

Кроме того, все варианты осуществления изобретения, описанные выше касательно композиции мультимера Fc, указанные в первом объекте изобретения, относятся также к третьему объекту изобретения.

Применение композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, для лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания может предусматривать любую форму введения, известную специалисту в данной области, такую как парентеральное введение, например, подкожное, внутривенное и/или чрескожное введение. В частности, применение композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, для лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания, включает подкожное введение.

Кроме того, применение композиции мультимера Fc, предлагаемой в настоящем изобретении, для лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания, может сопровождаться параллельным применением дополнительных иммуноглобулинов или их участков, нестероидных противовоспалительных средств (НСПВС) и/или иммунодепрессантов. Композицию мультимера Fc и иммуноглобулины или их участки, нестероидные противовоспалительные средства (НСПВС) и/или иммунодепрессанты можно вводить вместе в виде одного введения или раздельно в виде двух или большего количества введений.

Изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реагентами, указанными в описании, поскольку они могут различаться. Кроме того, терминология, применяемая в описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не направлена на ограничение объема настоящего изобретения. В контексте настоящего описания и в прилагаемой формуле изобретения употребление понятия в единственном числе включает ссылку на него во множественном числе, если из контекста четко не следует иное. Аналогично этому, слова «включать», «содержать» и «охватывать» следует толковать включительно, а не исключительно (как включающие нечто, а не исключающие его).

Если не указано иное, то все технические и научные понятия и любые сокращения, применяемые в описании, имеют те же значения, которые очевидны обычному специалисту в области, к которой относится изобретение. Хотя при воплощении на практике настоящего изобретения можно использовать любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные указанным в описании, предпочтительными являются методы и материалы, указанные в настоящем описании.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано с помощью представленных ниже чертежей и примеров, которые предназначены для объяснения, но не ограничения изобретения, и из которых можно почерпнуть дополнительные особенности, варианты осуществления и преимущества изобретения. Так, конкретные обсужденные модификации не должны быть истолкованы как ограничения объема изобретения. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что можно осуществлять различные эквиваленты, изменения и модификации без отклонения от объема изобретения, и таким образом, следует понимать, что указанные эквивалентые варианты осуществления изобретения должны быть включены в настоящее описание.

Описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 – содержание растворимых (физических) агрегатов (% HMW-видов) в зависимости от времени при 35°C для композиций 1-12;

на фиг. 2 – график объединенных данных для скоростей агрегации при 25 и 35°C в зависимости от измеренного pH;

на фиг. 3 – зависимость фрагментации (% LMW-видов) от времени (NR-Caliper) при 35°C для композиций 1-12;

на фиг. 4 – график объединенных данных для скоростей фрагментации (± С.К.О.) при 35°C в зависимости от измеренного pH;

на фиг. 5 – зависимость образования кислотных видов от времени (CEX) при 35°C для всех композиций;

на фиг. 6 - график объединенных данных для скоростей образования кислотных видов при 25 и 35°C в зависимости от измеренного pH;

на фиг. 7 – результаты анализа субвидимых частиц (а) количество частиц (количество частиц/мл) для частиц размером ≥ 10 мкм (черные столбики) и для частиц размером ≥ 25 мкм (серые столбики) в F1, F2, F3, F4, F5, F9, F12, F17 после хранения в течение 3 месяцев при 5°C и 25°C. (б) Обобщение данных о количестве частиц (количество частиц/мл) в F1, F2, F3, F4, F5, F9, F12, F17 для всех диапазонов размеров частиц: 2-5 мкм (черные столбики), 5-10 мкм (серые столбики), 10-25 мкм (поперечные полосы) и 10-25 мкм (диагональные полосы) после выдерживания в течение 3 месяцев при 5°C и 25°C;

на фиг. 8 – результаты определения в начальный момент времени (T0) % кислотных и основ́ных видов, полученные методом катионной обменной хроматографии;

на фиг. 9 – репрезентативная хроматограмма, полученная методом RP-HPLC, для количественной оценки окисления молекул мультимера Fc (CSL730) в композиции;

на фиг. 10 – график, на котором представлено сравнение начального (T0) % окисления коротких цепей (SC-видов), окисления длинных цепей (LC-видов) и относительного % общего окисления, измеренного методом RP-HPLC для всех композиций молекул мультимера Fc (CSL730);

на фиг. 11 – график, на котором представлены данные о повышении % общего окисления, измеренного методом RP-HPLC для всех композиций молекул мультимера Fc (CSL730) при исследовании стабильности при хранении вплоть до 2 месяцев при 25°C и 40°C;

на фиг. 12 – иллюстрация конструкции Fc, содержащей три Fc-домена, которые образованы четырьмя полипептидами типа CSL730. Первый полипептид (502) содержит один полипептид Fc, содержащий имеющие заряженные

аминокислоты на границе раздела CH3-CH3, отличные от wt-последовательности (506), объединенный в виде тандемной серии с содержащим выпуклость полипептидом Fc (504). Второй полипептид (508) содержит полипептид Fc, содержащий имеющие заряженные аминокислоты на границе раздела CH3-CH3, отличные от wt-последовательности (512), объединенный в виде тандемной серии с другим содержащим выпуклость полипептидом Fc (510). Третий и четвертый полипептиды (514 и 516 соответственно) каждый содержат имеющий полость полипептид Fc.

Примеры

Раздел 1 – Скрининговое исследование влияния pH-буфера-соли

Для изучения влияния pH, типа буфера и ионной силы на характеристики композиций, содержащих молекулу мультимера Fc (CSL730) в высоких концентрациях, получали композиции CSL730 с концентрацией белка 100 мг/мл и исследовали стабильность белка.

CSL730 представляет собой трехвалентный мультимер Fc, состоящий из двух длинных цепей, имеющих SEQ ID NO: 24, и двух коротких цепей, имеющих SEQ ID NO: 23, который получали практически согласно методу, описанному в WO 2015/168643 A2. В результате получали трехвалентный мультимер Fc, представленный на фиг. 12.

Материалы и методы

Материалы: Материалы, которые применяли в примерах, их каталожные номера и поставщики перечислены в таблице 1.

Таблица 1: Материалы, применяемые в примерах

Материал	Каталожный номер	Поставщик
Кассета (15 мл) с порогом отсечения по молекулярной массе (MWCO) 10 K	87731	Life Technologies Australia Pty Ltd
Флаконы для жидкости объемом 2 мл с горлышком 13 мм	BO2128	Schott
L-гистидин	1.043521.1000	Merck
Сахароза	1.00892.5000	Merck
Хлорид натрия	1.06400.5000	Merck
Моногидрат лимонной кислоты	1.00244.500	Merck
Уксусная кислота (ледяная)	1.00056.2500	Merck

Материал	Каталожный номер	Поставщик
Центрифужные фильтровальные устройства Amicon Ultra-15 (30 кДа)	UFC903024	Merck
Шприцевой фильтрующий блок Millex-GP, 0,22 мкм	SLGP033RS	Merck
Соляная кислота, 6М	1.10164.1000	Merck
Раствор гидроксида натрия, 4н.	1048	ACR Chemical Reagents

Получение композиций: Композиции получали, применяя в качестве исходного материала CSL730 (рекомбинантный совокупный очищенный белок мультимера Fc (концентрация: 146 мг/мл)). Совокупный очищенный белок подвергали диализу против 12 буферов, перечисленных ниже. После получения измеряли значение pH каждого буфера. С учетом потерь применяли 30%-ный избыток (в мг белка). Композиции подвергали диализу против примерно 1 л буфера в течение примерно 5 ч, после чего его заменяли на свежий буфер (примерно 1 л) и осуществляли диализ в течение ночи. Диализ проводили при 2-8°C в 15 мл 10K MWCO кассетах. Для диализа приготавливали следующие буферы:

1. 20мМ ледяная уксусная кислота, 50мМ сахароза, pH 4,5
2. 20мМ ледяная уксусная кислота, 50мМ сахароза, pH 5
3. 20мМ ледяная уксусная кислота, 50мМ сахароза, pH 5,5
4. 20мМ гистидин, 50мМ сахароза, pH 5
5. 20мМ гистидин, 50мМ сахароза, pH 5,5
6. 20мМ гистидин, 50мМ сахароза, pH 6
7. 20мМ гистидин, 50мМ сахароза, pH 6,5
8. 20мМ гистидин, 50мМ сахароза, pH 7
9. 20мМ гистидин, 50мМ сахароза, 100мМ NaCl, pH 6
10. 20мМ моногидрат лимонной кислоты, 50мМ сахароза, pH 5,5
11. 20мМ моногидрат лимонной кислоты, 50мМ сахароза, pH 6
12. 50мМ сахароза, pH 5.3 (без буфера)

После диализа измеряли концентрацию белка в каждом образце. Если устанавливали, что образцы были слишком сильно разбавлены, то их концентрацию повышали путем центрифугирования с использованием пробирок

Amicon (порог отсечения 30 кДа) для достижения целевой величины, составляющей 100 ± 10 мг/мл. После этого подтверждали концентрацию белка.

Заполнение и завершение процесса проводили в вытяжном шкафу с ламинарным потоком. Каждую композицию фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и вносили по 1 мл композиции в предварительно промаркированные стеклянные флаконы вместимостью 2 мл. Затем флаконы закупоривали и обжимали.

Краткое описание композиций, приготовленных для этого исследования, представлено в таблице 2. Целевая концентрация буфера для всех композиций составляла 20мМ. Ацетатный, гистидиновый и цитратный буферы применяли при различных соответствующих значениях pH для достижения надлежащей буферной емкости в диапазоне pH 4,5-7. В этом исследовании к композициям не добавляли никакого поверхностно-активного вещества. В качестве стабилизатора ко всем композициям добавляли 50мМ сахарозу для обеспечения минимального уровня стабильности. Следует отметить, что сахараза не оказывает влияния на ионную силу. Приготавливали одну композицию без буфера, поскольку известно, что белки в высоких концентрациях самобуферизуются. Значение pH раствора без буфера должно зависеть от самого белка.

Таблица 2: Краткое описание композиций, которые приготавливали для настоящего исследования

Композиция №	Буфер для композиции	pKa	Концентрация буфера (мМ)	Целевое pH	NaCl (мМ)	Концентрация сахарозы (мМ)
1	Ацетат	4,76	20	4,5	-	50
2			20	5,0	-	50
3			20	5,5	-	50
4	Гистидин	6,04	20	5,0	-	50
5			20	5,5	-	50
6			20	6,0	-	50
7			20	6,5	-	50
8			20	7,0	-	50
9			20	6.0	100	50

Композиция №	Буфер для композиции	pKa	Концентрация буфера (мМ)	Целевое pH	NaCl (мМ)	Концентрация сахарозы (мМ)
10	Цитрат	3,13 (1), 4.76 (2), 6,40 (3)	20	5,5	-	50
11			20	6.0	-	50
12	Без буфера	N/A	-	Зависит от молекулы	-	50

После заполнения заполненные композициями флаконы помещали в камеры для исследования стабильности при 2-8°C, 25°C или 35°C. Образцы анализировали сразу после заполнения/завершения процесса (анализ в момент времени «t0»/t=0) и в последующие заранее определенные моменты времени в течение периода вплоть до 4 недель. Для сравнения кинетики расщепления различных композиций измеряли константы скорости расщепления различными путями (со стандартной ошибкой) с использованием метода множественной линейной регрессии с охватом по меньшей мере 3 моментов времени (t=0, t=2 недели и t=4 недели). Метод множественной линейной регрессии применяли с использованием общей линейной модели (GLM) для построения графиков и подгонки результатов анализа к модели (уравнение 1).

$\%P = P_o + k.t$ [уравнение 1]

Методы, применяемые для анализа стабильности композиций:

Для анализа композиций в различные моменты времени применяли методы, пригодные для оценки стабильности, а именно: гель-фильтрацию (SEC), катионообменную хроматографию (CEX) и капиллярный гель-электрофорез (CGE) (Caliper). Кроме того, в различные моменты времени осуществляли мониторинг pH и внешнего вида (цвета, мутности и видимых частиц) композиций.

Методы, применявшиеся для исследования, цель, для которой применяли каждый метод, и моменты времени, в которые проводили каждый анализ, обобщены в таблице 3.

Таблица 3: Аналитические методы, которые применяли для исследования стабильности композиций

Метод	Цель	Момент времени (недели) и температура хранения (°C)		
		t0 (начальный момент времени)	2 недели	4 недели
Визуальное обследование	Видимые частицы, цвет, опалесценция, мутность	Начальный	25°C, 35°C	2-8°C, 25°C, 35°C
Измерение pH	Анализ pH	Начальный	25°C, 35°C	2-8°C, 25°C, 35°C
УФ-спектроскопия	Содержание белка (A280)	Начальный	25°C, 35°C	2-8°C, 25°C, 35°C
Гель-фильтрация (SEC)	Высокомолекулярные виды (растворимые агрегаты)	Начальный	25°C, 35°C	2-8°C, 25°C, 35°C
Катионообменная хроматография (CEX)	Кислотные, щелочные и основные виды	Начальный	25°C, 35°C	2-8°C, 25°C, 35°C
Капиллярный гель-электрофорез (CGE) (Caliper)	Низкомолекулярные виды	Начальный	25°C, 35°C	2-8°C, 25°C, 35°C

Ниже приведено описание аналитических методов:

Визуальное обследование: Визуальное обследование проводили с использованием инспекционного устройства, снабженного белым и черным фоном и люминесцентным освещением. Композиции во флаконах осторожно перемешивали без образования пузырьков, затем проверяли на цвет, прозрачность и наличие видимых частиц. Обследование проводили два независимых инспектора.

Измерение pH: pH измеряли с помощью pH метра Mettler Toledo SevenExcellence, снабженного электродом InLab®Ultra Micro ISM.

УФ-спектроскопия: Концентрацию белка измеряли с помощью нанофотометра IMPLEN P360 на основе определения A280/УФ композиций без разбавления. Измерения проводили по 3 раза для каждой композиции и рассчитывали средние величины результатов измерений.

Гель-фильтрация (SEC)-высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC): SEC-HPLC применяли для определения профиля агрегации белка

композиций. Для анализа образцов применяли систему фирмы Dionex (Ultimate 3000), снабженную колонкой Acquity BEH200 (фирма Waters, 4,6×150 мм). Образцы разводили до концентрации 10 г/л в соответствующем буфере, инъецировали 3,0 мкл и осуществляли разделение в изократических условиях при скорости потока 0,3 мл/мин. Подвижная фаза представляла собой буфер BES (pH 6,5), время погона составляло 15 мин. Детекцию интактного белка осуществляли при 280 нм при времени удерживания примерно 3,5 мин. Содержание мономерных видов, высокомолекулярных видов (HMWS, агрегаты) и низкомолекулярных видов (LMWS, фрагменты) определяли в виде относительной площади (%). Для валидации погона использовали внутренние и внешние стандарты.

Катионообменная хроматография (CEX): CEX-HPLC применяли для определения пропорций кислотных, основных и щелочных видов белков. Для анализа образцов применяли систему фирмы Dionex (Ultimate 3000), снабженную колонкой Propack WCX-10 (фирма Thermo Fisher, 4×250 мм). Образцы разводили до концентрации 10 г/л в соответствующем буфере, осуществляли инъекцию в объеме 3,0 мл и проводили разделение на основе градиента при скорости потока 0,7 мл/мин. В целом, метод состоял в следующем. Поочередно с периодом 55 мин применяли два водных буфера с pH 5 и pH 10 (на основе имидазола, пиперазина и ТРИС). Детекцию видов осуществляли при 280 нм, идентифицировали с использованием эталонного стандарта и представляли в виде выраженной в процентах относительной площади по сравнению с общей площадью.

Капиллярный гель-электрофорез (CGE) «Caliper»: С помощью капиллярного гель-электрофореза получали «картину полос» белка. Анализ осуществляли с использованием микрофлюидной системы LabChip GXII (фирма Perkin Elmer Australia Pty Ltd). Электрофорез белков на микрофлюидном чипе осуществляли посредством интеграции основных функций одномерного ДСН-ПААГ: они включали разделение, окрашивание, обесцвечивание и детекцию. Денатурированные белки загружали на чип непосредственно с титрационного микропланшета через капиллярное волокно. Затем образцы электрокинетически загружали и инъецировали в разделительный канал длиной 14 мм, содержащий матрицу с низкой вязкостью из раствора переплетенного. Все процедуры

подготовки образца осуществляли согласно протоколу производителя. Для образцов, анализируемых в невосстанавливающих условиях, раствор белка разводили буфером и водой Milliq до концентрации 1 г/л. Образцы, анализируемые в восстанавливающих условиях, разводили 1M DTT. Денатурацию осуществляли при 40°C в течение 20 мин в случае образцов, анализируемых в невосстанавливающих условиях, и при 80°C в течение 15 мин в случае образцов, анализируемых в восстанавливающих условиях. Результаты представляли в виде выраженных в процентах относительных площадей, соответствующих LMWS Intact и HMWS, в случае образцов, анализируемых в невосстанавливающих условиях. В случае образцов, анализируемых в восстанавливающих условиях, определяли фракции коротких цепей и длинных цепей.

Пример 1 – Визуальное обследование в момент времени t=0

Непосредственно перед заполнением проводили оценку внешнего вида всех композиций. Дополнительно оценивали внешний вид всех флаконов, заполненных всеми композициями, после заполнения/окончания процесса.

Из-за высокой концентрации белка все композиции имели коричневато-желтый цвет со слабой опалесценцией. Было установлено, что опалесценция увеличивалась с повышением pH. В композициях с pH 6,5 и 7 имело место осаждение CSL730, при этом более интенсивное осаждение происходило при pH 7. Хорошо известно, что для осаждения Fc-фрагментов можно применять более высокое значение pH. Позднее осажденные фрагменты могут восстанавливаться в результате солюбилизации в буферах с низким значением pH. Это было подтверждено для осажденной фракции рекомбинантного мультимера Fc (данные не представлены). Однако влияние указанного выдерживания при высоком pH на стабильность при хранении не до конца выяснено.

Перед заполнением флаконов все композиции фильтровали (включая осажденные композиции) и подвергали повторному обследованию после закупоривания и обжатия. Все композиции имели коричневато-желтый цвет, слегка опалесцировали и не содержали видимых частиц (включая композиции с pH 6,5 и pH 7,0). Ни в одной из приготовленных композиций не было выявлено гелеобразования.

В целом, результаты продемонстрировали, что в композициях с pH ≥ 6,5 происходило осаждение белка. Композиции с более низкими значениями pH вплоть до pH 4,5 были более предпочтительными, поскольку более низкие значения pH не приводили к осаждению белка.

Пример 2 – Измерения pH и концентрации белка в момент времени t=0

В момент времени t=0 проводили измерения pH и концентрации белка для всех композиций 1-12 (см. таблицу 2). Оценивали также отличия от целевых величин. Результаты обобщены в таблице 4

Измерения pH продемонстрировали, что измеренные значения pH большинства композиций находились в пределах ± 0,2 единиц pH от целевых значений pH за исключением содержащей ацетат композиции с целевым значением pH 4,5 и содержащее гистидин композиции с целевым значением pH 5,0, в которых значения pH находились в пределах 0,4 и 0,3 единиц от целевых значений pH соответственно. В целом, с учетом измеренных значений pH pH-скрининг в этом исследовании охватывал диапазон значений pH от 4,88 до 6,92.

Что касается измеренных концентрация белка, то в большинстве композиций концентрации находились в пределах целевой концентрации 100 ± 10 мг/мл. Исключениями являлись содержащие ацетат композиции с целевыми значениями pH 4,5 и 5,0. Указанные образцы по ошибке оказались слишком сильно разбавлены, так что это следует считать нарушением исследования. С другой стороны, содержащие гистидин композиции с pH 6,5 и 7,0 имели более низкую концентрацию в результате произошедшего осаждения.

Результаты свидетельствуют о том, что значение pH композиций в большинстве случаев соответствовало ожидаемому. За исключением содержащей ацетат композиции значительное снижение концентрации белка при pH ≥ 6,5 ассоциировалось с значительным осаждением белка в указанных условиях.

Таблица 4: Измеренные значения pH (и отклонения от целевых значений) и величины концентрации белка для всех композиций

Композиция №	Буфер для композиции	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	ΔpH	Измеренная концентрация белка (мг/мл)**
1	20мМ ацетат	4,5	4,9	0,4***	74 ± 1***

Композиция №	Буфер для композиции	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	ΔpH	Измеренная концентрация белка (мг/мл)**
2		5,0	5,2	0,2	72 ± 1***
3		5,5	5,6	0,1	102 ± 1
4	20мМ гистидин	5,0	5,3	0,3***	91 ± 1
5		5,5	5,7	0,2	107 ± 3
6		6,0	6,2	0,2	96 ± 5
7		6,5	6,6	0,1	82 ± 6****
8		7,0	6,9*	N/A	19 ± 1****
9	20мМ гистидин/150мМ NaCl	6,0	6,0	0,1	98 ± 5
10	20мМ цитрат	5,5	5,5	0,1	106 ± 10
11		6,0	5,9	0,1	91 ± 8
12	Без буфера	TBD	5,7	N/A	96 ± 4

*pH измеряли только после хранения в холодильнике в течение 4 недель, **целевое значение 100 ± 10 мг/мл, ***образец слишком сильно разбавлен (нарушение исследования), ****концентрация белка снижалась вследствие осаждения белка в образце

Пример 3 – Профиль высокомолекулярных (HMW) видов в момент времени t=0 по данных гель-фильтрации

Все композиции 1-12 (см. таблицу 2) анализировали с помощью гель-фильтрации для количественной оценки высокомолекулярных (растворимые агрегаты) видов в момент времени t=0 согласно описанному выше методу.

Профиль растворимых агрегатов для всех композиций характеризовался относительно низким % HMW во всех композициях (в целом < 1,5%) с некоторой тенденцией, свидетельствующей о том, что повышение pH приводить к более высокому проценту HMW-молекул (до момента выпадения осадка). Важно отметить, что начальный % HMW профильтрованных растворов композиций после осаждения с pH ≥ 6,5 также находился на уровне ниже 1,5%. Это свидетельствует о том, что хотя значение pH ≥ 6,5 не является приемлемым для приготовления композиции молекулы мультимера Fc с высокими

концентрациями белка, оно может оказаться пригодным для приготовления композиции рекомбинантной молекулы мультимера Fc с низкими концентрациями белка.

Пример 4 – Профиль низкомолекулярных (LMW) видов в момент времени t=0 по данным капиллярного гель-электрофореза

Все композиции 1-12 (см. таблицу 2) анализировали с помощью капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях с использованием метода Caliper (NR-Caliper) для количественной оценки низкомолекулярных видов (фрагментация) в момент времени t=0 согласно описанному выше методу.

Все композиции за исключением композиции 8 (выпадение осадка при pH ~ 7), характеризовались относительно низким % LMW (1,5 – 2,0%). В целом, данные свидетельствуют об отсутствии пропорциональной зависимости между pH и % LMW. Однако, повышение % LMW при pH 6,9 свидетельствует о том, что может существовать пороговое значение pH, выше которого будет происходить более существенное увеличение % LMW.

Пример 5 – Профиль кислотных и щелочных видов в момент времени t=0 по данным катионообменной хроматографии (CEX)

Все композиции анализировали с помощью катионообменной хроматографии (CEX) для количественной оценки кислотных и щелочных видов в момент времени t=0 согласно описанному выше методу.

За исключением композиций 7 и 8 все композиции характеризовались сопоставимыми уровнями % кислотных видов. Процент кислотных видов в композиции 7 был ниже (52%), а в композиции 8 был самым низким (45%).

Данные свидетельствуют об отсутствии связи между значением pH и начальным % кислотных видов. Снижение начального % кислотных видов в гистидиновом буфере с pH $\geq$ 6,5 свидетельствует о том, что может существовать пороговое значение pH, выше которого может происходить значительное снижение количества кислотных видов.

За исключением композиций 7 и 8 все композиции характеризовались сопоставимыми уровнями % щелочных видов. По сравнению со всеми остальными композициями в композициях 7 и 8 процент щелочных видов был ниже (4%).

Данные свидетельствуют об отсутствии связи между значением pH и начальным % щелочных видов. Снижение исходного % щелочных видов в гистидиновом буфере с pH ≥ 6,5 свидетельствует о том, что может существовать пороговое значение pH, выше которого может происходить снижение количества щелочных видов.

Однако на результаты анализа композиций 7 и 8 может оказывать влияние осаждение как кислотных, так и щелочных видов белка, как указано выше.

Обобщение результатов примеров 1 - 5

На основе анализа, проведенного в процессе обработки и сразу после заполнения/завершения процесса (T=0), можно сделать заключение о том, что композиции с pH ≥ 6,5 могут оказаться непригодными для приготовления композиций молекул мультимера Fc с высокими концентрациями (≥100 мг/мл).

Тем не менее, проводили исследования на стабильность всех композиций для оценки кинетики расщепления во всех композициях в рассматриваемом диапазоне значений pH.

Пример 6 – Визуальное обследование в различные моменты времени

Композиции 1 - 12 (см. таблицу 2) подвергали визуальному обследованию через 2 и 4 недели. Результаты обобщены в таблице 5.

Как указано выше, два инспектора (Insp 1 и Insp 2) проводили визуальное обследование внешнего вида в каждый момент времени и при каждой температуре. В большинстве случаев между инспекторами существовало общее согласие.

Не выявлено никаких изменений цвета и прозрачности для большинства композиций при всех температурах хранения. Цвет всех композиций оставался слегка коричнево-желтым, в то время как прозрачность оставалась слегка опалесцирующей. В композициях при более высоких температурах хранения начинали появляться видимые частицы, но наиболее значительное образование частиц происходило при pH ≥ 6,5. Важно отметить, что в композиции, включающей соль, не обнаружено видимых частиц по сравнению с такой же композицией с pH 6.

Результаты свидетельствуют о том, что в каждый момент визуального обследования при pH ≥ 6,5 образование частиц было более значительным по сравнению с образцами, имеющими более низкое pH.

Таблица 5: Результаты визуального обследования двумя инспекторами внешнего вида композиций, хранившихся в течение 2 или 4 недель при 2-8°C, 25°C и 35°C

Буфер	Целевое значение pH	2 недели				4 недели					
		25°C		35°C		2-8°C		25°C		35°C	
		Insp 1	Insp 2	Insp 1	Insp 2	Insp 1	Insp 2	Insp 1	Insp 2	Insp 1	Insp 2
20мМ ацетат	4.5	0	0	<5	<5	<5	<5	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0	0	<5	0	0	0	<5
	5.5	0	<5	0	0	0	0	<5	<5	0	<5
20мМ гистидин	5.0	0	0	0	<5	0	<5	<5	<5	<5	0
	5.5	0	0	0	<5	0	0	0	0	0	<5
	6.0	0	0	<5	<5	0	<5	0	0	0	0
	6.5	0	<5	<5	<5	Очень большое количество	Очень большое количество	<5	<5	0	<5
	7.0	ND	ND	0	<5	<5	Очень большое количество	<5	<5	0	<5
His/NaCl	6.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20мМ цитрат	5.5	0	5-10	<5	0	0	0	0	0	<5	<5
	6.0	0	0	<5	<5	0	0	<5	0	<5	<5
Без буфера	TBD	0	<5	0	0	0	<5	0	<5	0	<5

Пример 7 – Зависимость pH и концентрации белка от времени

Осуществляли мониторинг значения pH и концентрации белка в композициях 1 - 12 (см. таблицу 2) при 2-8, 25 и 35°C в течение вплоть до 4 недель.

В целом, в пределах экспериментальной погрешности результаты продемонстрировали минимальные сдвиги в pH и концентрации белка при 2-8, 25 и 35°C для всех композиций при хранении в течение вплоть до 4 недель.

Пример 8 – Взаимосвязь между образованием высокомолекулярных видов (HMW) и pH/буфером/солью с течением времени (гель-фильтрация)

Мониторинг % HMW-видов в композициях 1 - 12 (см. таблицу 2) при 2-8, 25 и 35°C осуществляли в течение вплоть до 4 недель. Репрезентативные графики изменения % HMW с течением времени для композиций, хранившихся при 35°C, показаны на фиг. 1. На фиг. 1 продемонстрировано, что сначала

происходило сильное увеличение % HMW-видов, после чего имело место более медленное увеличение количества видов с течением времени. Такая же тенденция обнаружена для композиций, хранившихся при 25°C.

Изменения (в %) агрегированных видов (% HMW) после хранения в течение 4 недель при 2-8°C представлены в таблице 6. Для всех композиций определяли константы скорости агрегации наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) при 25 и 35°C (по 3 моментам времени) методом множественной линейной регрессии с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Результаты обобщены в таблице 6.

Результаты, представленные в таблице 6, свидетельствуют о том, что скорость агрегации возрастала при увеличении температуры и значения pH. Более высокие скорости агрегации имели место при pH ≥ 6,0. При 35°C тенденция была более выражена. Следует отметить, что композиция в гистидиновом буфере с pH 6,9 (композиция 8) казалась наиболее стабильной. Однако это являлось артефактом, обусловленным очень низкой концентрацией белка в указанной композиции в результате осаждения белка (18 мг/мл) по сравнению с намного более высокой концентрацией белка во всех других композициях (см. таблицу 4).

Тип буфера оказывал слабое влияние на скорость агрегации. При эквивалентном значении pH различные буферы обладали сходными свойствами. Самобуферизованная композиция (композиция 12) была несколько менее стабильной, чем композиция с эквивалентным pH, содержащая буфер (композиция 5). Добавление соли (приводящее к повышению ионной силы) не оказывало существенного влияния на улучшение агрегационных характеристик.

Данные о тенденции к агрегации обобщены на фиг. 2, на которой представлены объединенные данные (скорости агрегации при 25 и 35°C) в зависимости от измеренного pH (без композиции с pH 7, которая не является репрезентативной с точки зрения агрегационных характеристик). На фиг. 2 представлено общее нелинейное увеличение скорости агрегации по мере увеличения измеренного pH.

Таблица 6: Обобщение полученных методом SEC данных об агрегации (% HMW), представлены изменения % HMW после хранения в течение 4 недель при 2-8°C (5-я колонка), константы скорости агрегации k (± SE) при 25°C (6-я колонка) и при 35°C (7-я колонка).

Композиция №	Буфер	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	Δ%HMW после хранения в течение T=4 недели (2-8°C)	k при 25°C(± SE) (%/неделя)	k при 35°C (± SE) (%/неделя)
1	20мМ ацетат	4,5	4,9	0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
2		5,0	5,2	0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0
3		5,5	5,6	0,7	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
4	20мМ гистидин	5,0	5,3	0,4	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1
5		5,5	5,7	0,7	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
6		6,0	6,2	1,0	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2
7		6,5	6,6	1,8	0,8 ± 0,3	1,1 ± 0,3
8		7,0	6,9	~0	0,06*	0,2 ± 0,0
9	20мМ гистидин/NaCl	6,0	6,0	0,8	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
10	20мМ цитрат	5,5	5,5	0,5	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
11		6,0	5,9	0,8	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
12	Без буфера	TBD	5,7	1,0	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1

*скорость оценивали по 2 точкам

Пример 9 – Взаимосвязь между образованием фрагментов (LMW) и pH/буфером/солью с течением времени (невосстанавливающий Caliper)

Осуществляли мониторинг фрагментации композиций 1 - 12 (см. таблицу 2) при 2-8, 25 и 35°C в течение вплоть до 4 недель. Репрезентативные графики изменений % фрагментов с течением времени для композиций, которые хранили при 35°C, представлены на фиг. 3. На фиг. 3 продемонстрировано, что сначала происходило сильное увеличение % LMW-видов (фрагментов), после чего имело место более медленное увеличение количества видов с течением времени. Такая же тенденция обнаружена для композиций, хранившихся при 25°C.

Данные о % изменения фрагментов после хранения в течение 4 недель при 2-8°C представлены в таблице 7. Константы скорости фрагментации наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) определяли для композиций при 25

и 35°C (по 3 моментам времени) методом множественной нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Метод множественной линейной регрессии применяли с использованием общей линейной модели (GLM) для построения графиков и подгонки результатов анализа к модели (уравнение1). Результаты обобщены в таблице 7.

Полученные данные продемонстрировали, что обычно при 2-8°C происходила небольшая фрагментация. Однако скорость фрагментации возрастала при увеличении температуры хранения и pH (pH ≥ 6,0). Более значительные изменения % LMW выявлены при 2-8°C для композиции с ~ pH 7. При 25°C и 35°C скорость фрагментации также была наиболее высокой в композиции 8 при ~ pH 7 (несмотря на наименьшую концентрация белка, составлявшую 18 мг/мл), и затем несколько снижалась при pH 6,5. При одном и том же значении pH тип буфера оказывал лишь слабое влияние на скорость агрегации. Не было обнаружено явных преимуществ при добавлении NaCl (более высокая ионная сила).

Данные о тенденции к фрагментации обобщены на фиг. 4, на которой представлены объединенные данные (скорости фрагментации при 35°C со стандартными ошибками) в зависимости от измеренного pH. На фиг. 4 продемонстрировано, что в целом скорость фрагментации увеличивалась по мере увеличения измеренного pH (≥ pH 6,0), как это было установлено и для агрегации.

Таблица 7: Обобщение полученных методом NR-Caliper данных о фрагментации (% LMW), сравнение изменений содержания фрагментов после хранения в течение 4 недель при 2-8°C (5-колонка), константы скорости фрагментации k (± SE) при 25°C (6-я колонка) и при 35°C (7-я колонка)

Образец №	Буфер	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	Δ% фрагментов после T=4 недели (2-8°C)	k при 25°C (± SE)* (%/неделя)	k при 35°C (± SE)* (%/неделя)
1	20мМ ацетат	4,5	4,9	0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1
2		5,0	5,2	0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
3		5,5	5,6	0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
4	20мМ гистидин	5,0	5,3	0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
5		5,5	5,7	0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0.1
6		6,0	6,2	~0	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1

Образец №	Буфер	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	Δ% фрагментов после T=4 недели (2-8°C)	k при 25°C (± SE)* (%/неделя)	k при 35°C (± SE)* (%/неделя)
7	20мМ гистидин/NaCl	6,5	6,6	0,1	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1
8		7,0	6,9	0,3	0,5*	1,3 ± 0,1
9		6,0	6,0	~0	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
10	20мМ цитрат	5,5	5,5	0,1	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2
11		6,0	5,9	0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
12	Без буфера	TBD	5,7	0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1

*скорость оценивали по 2 точкам.

Пример 10 – Взаимосвязь между образованием кислотных видов и pH/буфером/солью с течением времени (катионообменная хроматография)

Осуществляли мониторинг кислотных видов в композициях 1 - 12 (см. таблицу 2) при 2-8, 25 и 35°C в течение вплоть до 4 недель. Репрезентативные графики изменений % кислотных видов с течением времени для композиций, которые хранили при 35°C, представлены на фиг. 5. На фиг. 5 продемонстрировано, что (за исключением содержащей гистидин композиции с ~ pH 7) имеет место более линейное увеличение % кислотных видов с течением времени по сравнению с графиками % HMW (фиг. 1) и % LMW (фиг. 3). Такая же тенденция выявлена также и для композиций, которые хранили при 25°C.

Данные о % изменения кислотных видов после хранения в течение 4 недель при 2-8°C представлены в таблице 8. Константы скорости образования кислотных видов наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) определяли для композиций при 25 и 35°C (по 3 моментам времени) методом линейной регрессии с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Метод множественной линейной регрессии применяли с использованием общей линейной модели (GLM) для построения графиков и подгонки результатов анализа к модели (уравнение 1). Результаты также обобщены в таблице 8.

Полученные данные показали, что обычно при 2-8°C происходила небольшая фрагментация. Однако скорость образования кислотных видов возрастала при увеличении температуры хранения и pH (pH ≥ 6,0). Наиболее высокие уровни кислотных видов обнаружены через 4 недели при 2-8°C в

композиции с ~ pH 7. При 25°C и 35°C скорость образования кислотных видов была также наиболее высокой в композиции 8 с ~ pH 7 (несмотря на наименьшую концентрацию белка, составлявшую 18 мг/мл), и далее в порядке уменьшения в композиции с pH 6,5.

Было установлено также, что при одном и том же значении pH тип буфера оказывал влияние на скорость образования кислотных видов, при этом композиции в гистидиновом буфере обличались более высокой стабильностью при хранении по сравнению с композициями в ацетатном или цитратном буферах с таким же значением pH.

Добавление NaCl (более высокая ионная сила) приводило к более высокой стабильности при хранении касательно скорости образования кислотных видов по сравнению с композицией без соли при таком же значении pH.

Данные о тенденции к образованию кислотных видов в зависимости от pH обобщены на фиг. 6, на которой представлены обобщенные данные (скорости образования кислотных видов при 25 и 35°C) в зависимости от измеренного значения pH. На фиг. 6 продемонстрировано, что скорость образования кислотных видов повышалась с увеличением измеренного значения pH (> pH 6,0), что было установлено и для агрегации и для фрагментации.

Таблица 8: Обобщение полученных с помощью CEX данных (% кислотных видов), представлены сравнение изменений % кислотных видов после хранения в течение 4 недель при 2-8°C (5-я колонка) и константы скорости образования кислотных видов k (± SE) при 25°C (6-я колонка) и при 35°C (7-я колонка)

Композиция №	Буфер	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	Δ% кислотных видов через T=4 недели (2-8°C)	k при 25°C (± SE)* (%/неделя)	k при 35°C (± SE)* (%/неделя)
1	20мМ ацетат	4,5	4,9	0,2	0,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1
2		5,0	5,2	0,	0,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1
3		5,5	5,6	0,3	0,7 ± 0,0	2,7 ± 0,1
4	20мМ гистидин	5,0	5,3	0,1	0,4 ± 0,1	2,0 ± 0,2
5		5,5	5,7	~0	0,4 ± 0,1	1,9 ± 0,2
6		6,0	6,2	0,3	0,6 ± 0,1	2,3 ± 0,0
7		6,5	6,6	~0	1,2 ± 0,2	3,5 ± 0,2

Композиция №	Буфер	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	Δ% кислотных видов через T=4 недели (2-8°C)	k при 25°C (± SE)* (%/неделя)	k при 35°C (± SE)* (%/неделя)
8		7,0	6,9	1,7	2,6*	6,2 ± 0,5
9	20мМ гистидин/NaCl	6,0	6,0	0,4	0,3 ± 0,1	1,5 ± 0,0
10	20мМ цитрат	5,5	5,5	0,1	0,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1
11		6,0	5,9	0,2	0,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1
12	Без буфера	TBD	5,7	0,5	0,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1

*скорость оценивали по 2 точкам

Выводы по результатам примеров 1 - 10

Результаты свидетельствуют о том, что для предупреждения осаждения белка в композициях молекул мультимера Fc (CSL730) при высоких концентрациях (100 мг/мл) требуются специфические условия. Установлено, что значения pH ≥ 6,5 могут оказаться непригодными для композиций молекул мультимера Fc (CSL730) при высоких концентрациях (100 мг/мл) вследствие осаждения. Композиции молекул мультимера Fc (CSL730) при высоких концентрациях белка (100 мг/мл) были более стабильными в отношении агрегации, фрагментации и образования кислотных видов при pH ниже 6. Кроме того, композиции молекул мультимера Fc (CSL730) при высоких концентрациях белка (100 мг/мл) были более стабильными в отношении образования кислотных видов при высокой концентрации соли, а также при использовании гистидинового буфера.

Раздел 2 – Скрининговое исследование стабилизаторов

Осуществляли скрининговые исследования эксципиентов для изучения влияния типа стабилизаторов (сахара/полиолы и аминокислоты), уровней стабилизаторов, уровней поверхностно-активных веществ, типа антиоксидантов и уровней антиоксидантов на жидкие композиции, содержащие молекулы мультимера Fc (CSL730) с концентрациями белка 10-100 мг/мл. Параллельно проводили кратковременное исследование (в течение 3 месяцев) для изучения стабильности при хранении в зависимости от концентрации белка. В целом,

получали содержащие CSL730 композиции с концентрациями белка от 10 до 100 мг/мл и изучали в отношении стабильности белка.

Материалы и методы

Материалы: Применяемые в примерах материалы были такими же, что и указанные в разделе 1; дополнительные материалы, которые применяли в этом разделе, их каталожные номера от поставщиков и поставщики перечислены в таблице 9.

Таблица 9: Материалы, применяемые в примерах, соответствующие каталожные номера от поставщиков и поставщики

Материал	Каталожный номер	Поставщик
Кассеты для диализа (30 мл) с MWCO 10 кДа Slide-A-Lyzer® G2	87732	Thermofisher Scientific
Кассеты для диализа (70 мл) с MWCO 10 кДа Slide-A-Lyzer® G2	87733	Thermofisher Scientific
Прозрачные флаконы Fiolax 2 мл с горлышком 13 мм	BO2128	Schott
13-миллилитровая пробка для инъекции FluroTec	19700004	West Pharmaceutical Services
13-миллилитровые откидные крышки для флаконов	F013DBL-1K	West Pharmaceutical Services
L-пролин	1.07430.1000	Merck
Моногидрохлорид L-аргинина	1.01544.1000	Merck
Дигидрат D (+)-трегалозы	T9531-100G	Sigma
D-сорбит	S1876	Sigma
Полисорбат 80	7815	NOF
L-глутатион восстановленный	G4251	Sigma
L-метионин	M8439	Sigma

Получение композиций: Композиции приготавливали с использованием рекомбинантного совокупного очищенного белка мультимера Fc CSL730 в концентрации 120 мг/мл, приготовленный в растворе, содержащем 20мМ гистидин, 40мМ NaCl и 200мМ пролин, pH 6,0.

Гистидин представлял собой буфер, выбранный для всех композиций, в которых целевая концентрация буфера составляла 20мМ. Значение pH было

фиксированным во всех композициях, кроме одной, и составляло 5,25 ± 0,1. Полисорбат 80 (PS80) представлял собой поверхностно-активное вещество, выбранное для всех композиций. Концентрация PS80 была фиксированной во всех композициях, кроме одной, и составляла вплоть до 0,02% (мас./об.) Применяли различные стабилизаторы (пролин, аргинин, сахарозу, трегалозу и сорбит) в диапазоне целевых концентраций от 200 до 300мМ. Четыре композиции содержали антиоксиданты (либо метионин, либо восстановленный глутатион (GSH)) в различных концентрациях (1-20мМ). План эксперимента (и следовательно различия в композициях) разрабатывали таким образом, чтобы преимущественно изменять каждый раз один фактор (OFAT). Краткое описание композиций, приготовленных для осуществления этого опыта, представлено в таблице 10.

Для диализа приготавливали следующие буферы:

1. 20мМ гистидин, 250 сахароза, pH 5,25.
2. 20мМ гистидин, 250мМ трегалоза, pH 5,25.
3. 20мМ гистидин, 250мМ сорбит, pH 5,25.
4. 20мМ гистидин, 250мМ аргинин, pH 5,25.
5. 20мМ гистидин, 167мМ аргинин, 83мМ сахароза, pH 5,25.
6. 20мМ гистидин, 225мМ сахароза, pH 5,25.

Для приготовления композиций (2-6, 8-16, 18) порции объемом примерно 30-50 мл совокупного очищенного белка подвергали диализу против каждого из 6 указанных выше буферов. После приготовления измеряли значение pH каждого буфера. С учетом потерь применяли 30%-ный избыток (в мг белка). Композиции подвергали диализу против примерно 1 л буфера в течение примерно 5 ч, после чего его заменяли на свежий буфер (примерно 1 л) и осуществляли диализ в течение ночи. Диализ проводили при 2-8°C в 30- или 70-миллилитровых MWCO-кассетах 10K.

После диализа измеряли концентрацию белка в каждом диализате Если устанавливали, что образцы были слишком сильно разбавлены, то их концентрацию повышали путем центрифугирования с использованием пробирок Amicon для достижения целевой величины, составляющей 120 ± 5 мг/мл. После этого подтверждали концентрацию белка.

Получали следующие маточные растворы и применяли их качестве растворов для добавления при приготовлении конечных композиций:

1. 20мМ гистидин, 5,75% (мас./об.) (500мМ) пролина, 0,02% (мас./об.) PS80, pH 5,25.

2. 20мМ гистидин, 17,04% (мас./об.) сахарозы, 0,02% (мас./об.) PS80, pH 5,25,

3. 10% (мас./об.) PS80.

4. 20мМ гистидин, 200мМ пролин, 40мМ хлорид натрия, 0,02% (мас./об.) PS80, pH 5,8 (обозначены как «разбавитель для CSL730),

Лекарственная субстанция (DS) содержала 118 мг/мл рекомбинантного мультимера Fc CSL730, 20мМ гистидин, 40мМ NaCl, 200мМ пролин и 0,02% (мас./об.) PS80, pH 6,0. DS разводили, добавляя соответствующие объемы маточного раствора 1 или меточного раствора 2 для достижения концентрации белка 100 ± 5 мг/мл, после чего доводили значение pH до 5,25 ± 0,1 с помощью 0,1M HCl с получением композиции 1 и композиции 7 соответственно. Композицию 17 приготавливали путем непосредственного разведения DS до 100 ± 5 мг/мл, используя маточный раствор 4, поддерживая значение pH на уровне 5,8 ± 0.1.

После стадии концентрирования и подтверждения концентрации белка (измерения при A280) композиции 2-6, 8-16 и 18 при необходимости соответствующим образом разводили буферами 1-6 и конечное значение pH доводили до 5,25 ± 0,1 с помощью 0,1M HCl. Концентрацию белка подтверждали после осуществления стадии регулирования значения pH.

Заполнение и завершение процесса проводили в вытяжном шкафу с ламинарным потоком. Каждую композицию и соответствующее ей плацебо фильтровали через стерильный фильтр из полиэфирсульфона (PES) с размером пор 0,22 мкм и вносили по 0,8 мл композиции в предварительно промаркированные стеклянные флаконы вместимостью 2 мл. Затем флаконы закупоривали и обжимали. В целом, приготавливали 17 жидких композиций и 13 плацебо.

После заполнения/завершения процесса флаконы, заполненные жидкими композициями, помещали в камеры для исследования стабильности при 2-8°C, 25°C или 40°C. Образцы анализировали сразу после заполнения/завершения

процесса (анализ в момент времени «T0»/T=0), после чего осуществляли анализ в заранее определенные последовательные моменты времени в течение периода вплоть до 6 месяцев. Для сравнения кинетики расщепления различных композиций измеряли константы скорости расщепления различными путями (со стандартной ошибкой) с помощью метода множественной линейной регрессии с использованием программного обеспечения JMP и Excel. Метод множественной линейной регрессии применяли с использованием общей линейной модели (GLM) для построения графиков и подгонки результатов анализа к модели (уравнение 1).

$$\%P = P_o + k.t \qquad \text{[уравнение 1]}$$

Таблица 10: Краткое описание композиций, приготовленных для скринингового изучения эксципиентов

Композиция №	Целевая концентрапция CSL730. (мг/мл)	Целевая концентрация PS80 (% (мас./об.))	Целевое значение pH	Тип стабилизатора	Конц. стабилизатора (мМ)	Тип и конц. антиоксиданта (мМ)	Молярное соотношение (белок:стабилизатор)
F1*	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Пролин	250		1:417
F2	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	250		1:417
F3	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Трегалоза	250		1:417
F4	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сорбит	250		1:417
F5	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Аргинин	250		1:417
F6	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза/аргинин	83/167		1:417
F7*	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза/пролин	83/167		1:417
F8	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	225		1:375
F9	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	300		1:500
F10	70	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	250		1:625
F11	10	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	250		1:4167
F12	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	250	10мМ метионин	1:417
F13	100 ± 5	0,02	5.25 ± 0.1	Сахароза	250	20мМ метионин	1:417
F14	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	250	1мМ восстановленный GSH	1:417
F15	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	250	10мМ восстановленный	1:417

						GSH	
F17*	100 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Пролин	200		1:333
F18	100 ± 5	0,04	5,25 ± 0,1	Сахароза	250		1:417

*F1, F7 и F17 представляли собой единственные композиции, которые не подвергали диализу. Таким образом, эти композиции имели низкие уровни NaCl (~30-40мМ).

Методы, применяемые для анализа стабильности композиций:

Для анализа композиций в различные моменты времени применяли методы, пригодные для оценки стабильности, а именно: гель-фильтрацию (SEC), катионообменную хроматографию (CEX), капиллярный гель-электрофорез (CGE) (Caliper) и для анализа окисления HPLC с обращенной фазой (RP-HPLC). Кроме того, в различные моменты времени осуществляли мониторинг значения pH, внешнего вида (цвета, мутности и видимых частиц) и субвидимых частиц (SVP) композиций.

Методы, применяемые для исследования, и цель, для которой применяли каждый метод, обобщены в таблице 11.

Условия хранения и моменты времени осуществления анализа обобщены в таблице 12.

Таблица 11: Аналитические методы, применяемые для исследования стабильности композиций, и их цель

Метод	Цель
Визуальное обследование	Видимые частицы, цвет, опалесценция, мутность
Анализ частиц с динамической визуализацией (DIPA)	Количество субвидимых частиц
Измерение pH	Анализ pH
Осмолярность	Измерение осмолярности
Тестирование полисорбата 80 (PS80)	Количественная оценка PS80
УФ-спектроскопия	Содержание белка (A280)
Гель-фильтрация (SEC)	Высокомолекулярные виды (растворимые агрегаты)
Катионообменная хроматография (CEX)	Кислотные, щелочные и основные виды
Капиллярный гель-электрофорез (CGE) (Caliper)	Низкомолекулярные виды
Высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой (RP-HPLC)	Количественная оценка окисления

Таблица 12: Краткое описание условий хранения и моментов времени проведения анализа

Условия хранения	Моменты времени
2-8°C	0, 3, 6 месяцев
25°C	0, 1, 2, 3, 6 месяцев
40°C	0, 1, 2, 3 месяца

Ниже приведено описание аналитических методов:

Визуальное обследование, измерение pH, УФ-спектроскопию, гель-фильтрацию, катионообменную хроматографию и и капиллярный гель-электрофорез осуществляли согласно описанному выше в разделе 1.

Осмолярность: Осмолярность композиций измеряли в начальный момент времени (T0) по понижению температуры замерзания с использованием осмометра Gonotec Osmomat 3000. Объемы образов составляли 300 мкл. Измерения для каждой композиции проводили трижды и затем рассчитывали средние величины измерений.

Определение количества субвидимых частиц: Ограниченный анализ субвидимых частиц с использованием устройства FlowCam Biologics (анализ частиц с динамической/потоковой визуализацией – методика DIPA) осуществляли для представляющих интерес композиций при 2-8°C и 25°C только после хранения в течение 3 месяцев. Использовали минимальный объем образца 0,5 мл. Измерения для каждой композиции проводили трижды и затем рассчитывали средние величины измерений.

Анализ окисления с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC): Метод RP-HPLC использовали для определения общего количества окисленных видов в виде процента от общей площади, и относительного уровня окисления как короткой, так и длинной цепей. Приготовление образца включало разведение образца до концентрации 10 г/л в соответствующем буфере с последующим применением гуанидина в качестве денатурирующего реагента и DL-дитиотреитола (DTT) для восстановления дисульфидных связей. На этой стадии создавали две идентичные длинные цепи и две идентичные короткие цепи. Для предупреждения окисления фрагментов осуществляли последующую стадию разведения с использованием раствора, содержащего L-метионин в высокой концентрации, с последующим анализом образца с использованием образца с концентрацией 2 мкг/мкл. Для

анализа образцов применяли устройство Thermo Ultimate 3000 (или эквивалентое), снабженное колонкой AdvanceBio RP-mAb дифенил 3,5 мкм, 2,1 × 50 мм. Инъецируемый объем составлял 3 мкл и разделение осуществляли методом на основе градиента при скорости потока 0,35 мл/мин. Температуру колонки устанавливали на уровне 65°C. В целом, метод состоял в следующем: два буфера (0,1% трифторуксусной кислоты в воде и 0,08% ТФК в ацетонитриле) чередовали в течение 20 мин. Детекцию видов осуществляли при 280 нм, идентифицировали с использованием эталонного стандарта и представляли в виде выраженной в процентах относительной площади по сравнению со всей площадью.

Анализ полисорбата 80 (PS80): RP-HPLC применяли для определения количества PS80 в начальный момент времени (T0) в различных композициях. В целом, метод состоял в следующем: стандарт PS80 и образцы обрабатывали этанолом, а затем 0,1M KOH при 40°C, после чего осуществляли анализ в образце олеиновой кислоты, образовавшейся в результате гидролиза, методом HPLC с обращенной фазой. Для анализа образов применяли систему Dionex (Ultimate 3000) (или эквивалентную), снабженную колонкой с обращенной фазой Nova-Pak® C18 3,9 × 150 мм, 4 мкм (фирма Waters). Инъецируемый объем составлял 15 мкл и разделение проводили, используя изократический метод при скорости потока 2,0 мл/мин. Подвижная фаза представляла собой буфер, содержащий 80% ацетонитрила с 20% дигидрофосфата калия с pH 2,8. Температуру колонки устанавливали на уровне 40°C. Детекцию видов осуществляли при 280 нм и количественно оценивали с использованием стандартной калибровочной кривой, созданной с применением стандартных растворов PS80. Данные выражали в виде % ((мас./об.)) PS80.

Пример 1 – Визуальное обследование в момент времени T0 и в последующий период

Все заполненные флаконы обследовали в отношении внешнего вида после заполнения/завершения процесса (визуальное обследование 100% образцов) два инспектора (Insp 1 и Insp 2, как указано выше) в каждый момент времени и при каждой температуре. Не обнаружено никаких существенных расхождений в описании внешнего вида между осуществляющими оценку специалистами.

За исключением композиции с концентрацией 10 мг/мл все остальные композиции имели цвет от слегка коричневато-желтого (BY) (композиции с концентрацией 70 мг/мл композиция) до BY (композиции с концентрацией 100 мг/мл) со слабой опалесценцией, связанной с высокой концентрацией белка. В некоторых композициях и в плацебо случайно обнаружены 0-2 видимые частицы. Тщательное изучение, с учетом знаний о белке, показало, что видимые частицы были экзогенными по своей природе (вероятно, были внесены в процессе заполнения/завершения процедуры). В композициях с высокими концентрациями не происходило гелеобразование.

Композиции 1-18 (см. таблицу 10) визуально обследовали в течение вплоть до 6 месяцев при различных температурах. Цвет большинства композиций не изменялся при всех температурах хранения от цвета в момент T0 (бесцветная композиция с концентрацией 10 мг/мл, слегка BY композиция с концентрацией 70 мг/мл и BY композиции с концентрацией 100 мг/мл). Композиции с восстановленным GSH имели несколько более выраженный BY-цвет по сравнению с композициями с такой же концентрацией белка. Прозрачность не изменялась (прозрачная композиция с концентрацией 10 мг/мл композиция и все другие со слабой опалесценцией). Количество частиц не изменялось относительно количества в момент T0 (0-2) вне зависимости от температуры и периода хранения. Ни в одной из композиций не происходило гелеобразование во время периода хранения при любой температуре.

С течение времени в содержащих GSH плацебо обнаружено изменение цвета до слегка BY- или BY-цвета. Цвет усиливался по мере увеличения периода хранения, температуры хранения и повышения концентрации GSH. Плацебо, соответствующие другим композициям, оставались прозрачными и бесцветными вне зависимости от температуры и периода хранениях.В целом, количество частиц не изменялось относительно T0.

Пример 2 – Осмолярность, pH, концентрация белка и полисорбата 80, измеренные в T0 и в последующий период

Измерения осмолярности, pH, концентрации белка и концентрации полисорбата 80 (PS80) во всех композициях 1-18 (см. таблицу 10) проводили в начальный момент времени (T0). Результаты обобщены в таблице 13.

Представленные в таблице 13 результаты свидетельствуют о том, что концентрация белка составляла 100 ± 5 мг/мл во всех высоко концентрированных композициях. Измерения pH продемонстрировали, что измеренные значения pH находились в пределах ± 0,1 единицы pH для всех композициях по сравнению с целевыми значениями pH. Измеренная осмолярность, как правило, составляла 300-390 мОсм/кг за исключением содержащих аргинин композиций (композиции 5, 6), в которых значения осмолярности превышали 400 мОсм/кг. Концентрации PS80 во всех композициях находились максимум в пределах ± 0,003% (мас./об.) относительно целевых концентраций PS80.

Осуществляли мониторинг pH и концентраций белка в композициях 1-18 (см. таблицу 10) при 2-8, 25 и 40°C в течение вплоть до 6 месяцев.

В таблице 14 обобщены результаты измерений pH при различных температурах и периодах хранения. В пределах погрешности эксперимента результаты показали минимальные сдвиги (в пределах максимум ± 0,1 единицы) значений pH при всех температурах для всех композиций в пределах изучаемого периода времени.

В таблице 15 обобщены результаты измерений концентрации белка при различных температурах и периодах хранения. В пределах погрешности эксперимента результаты показали небольшие сдвиги в концентрации белка с течением времени. Для трех композиций обнаружены относительно более значительные вариации концентрации с течением времени (F3 при 40°C и F15 при 25°C и 40°C), но ни в одной из указанных композиций не обнаружено осаждение белка. Среднее изменение концентрации белка составляло 1,0 мг/мл при 2-8°C, 1,7 мг/мл при 25°C и 1,6 мг/мл при 40°C в течение периода измерения. Можно предположить, что это является результатом относительной вариабельности анализа применяемого высокопроизводительного метода.

Таблица 13: Измеренные концентрация белка (± стандартное отклонение), pH, осмолярность (± стандартное отклонение) и концентрация полисорбата 80 (PS80) во всех композициях в начальный момент времени (T0)

Код композиции	Целевая концентрация белка (мг/мл)	Измеренная концентрация белка (мг/мл)	Целевое pH	Измеренное pH	Измеренная осмолярность (мОсм/кг)	Концентрация PS80 (% (мас./об.))
F1	100	102,8 ± 2,2	5,25	5,25	343 ± 2	0,019
F2	100	95,9 ± 1,1	5,25	5,20	298 ± 2	0,020

Код композиции	Целевая концентрация белка (мг/мл)	Измеренная концентрация белка (мг/мл)	Целевое pH	Измеренное pH	Измеренная осмолярность (мОсм/кг)	Концентрация PS80 (% (мас./об.))
F3	100	100,7 ± 0,6	5,25	5,13	308 ± 3	0,019
F4	100	97,5 ± 0,0	5,25	5,18	297 ± 4	0,020
F5	100	99,2 ± 2,8	5,25	5,18	473 ± 2	0,021
F6	100	103,8 ± 1,3	5,25	5,12	424 ± 5	0,020
F7	100	100,5 ± 1,9	5,25	5,20	389 ±4	0,017
F8	100	102,3 ± 0,5	5,25	5,18	285 ± 1	0,019
F9	100	95,2 ± 0,6	5,25	5,20	364 ± 3	0,020
F10	70	67,8 ± 1,5	5,25	5,20	302 ± 3	0,019
F11	10	9,9 ± 0,3	5,25	5,15	311 ± 1	0,020
F12	100	92,6 ± 0,8	5,25	5,16	320 ± 4	0,021
F13	100	97,4 ± 3,3	5,25	5,22	324 ± 2	0,022
F14	100	96,6 ± 0,7	5,25	5,20	301 ± 2	0,021
F15	100	95,4 ± 0,9	5,25	5,15	302 ± 3	0,021
F17	100	101,2 ± 2,3	5,25	5,13	291 ± 4	0,018
F18	100	100,3 ± 1,2	5,25	5,16	296 ± 1	0,043

Таблица 14: Измеренные значения pH для всех композиций при различных температурах хранения в течение вплоть до 6 месяцев (измерения не проводили для композиций в условиях хранениях, которые обозначены затененными областями)

Код композиции	2-8°C			25°C			40°C	
	T0	T3	T6	T0	T3	T6	T0	T3
F1	5,25	5,28	5,22	5,25	5,26	5,23	5,25	5,29
F2	5,20	5,26	5,22	5,20	5,24	5,22	5,20	5,25
F3	5,13	5,23	5,18	5,13	5,22	5,19	5,13	5,29
F4	5,18	5,29	5,21	5,18	5,23	5,23	5,18	5,32
F5	5,18	5,26	5,18	5,18	5,21	5,19	5,18	5,34
F6	5,12	5,25		5,12	5,20		5,12	5,31
F7	5,20	5,31		5,20	5,27		5,20	5,34
F8	5,18	5,27		5,18	5,21		5,18	5,26
F9	5,20	5,23	5,19	5,20	5,18	5,23	5,20	5,28
F10	5,20	5,27		5,20	5,17		5,20	5,20
F11	5,15	5,25		5,15	5,18		5,15	5,18
F12	5,16	5,24	5,21	5,16	5,19	5,21	5,16	5,31
F13	5,22	5,19		5,22	5,19		5,22	5,30
F14	5,20	5,22		5,20	5,15		5,20	5,31
F15	5,15	5,14		5,15	5,14		5,15	5,25
F17	5,13	5,13	5,09	5,13	5,14	5,10	5,13	5,25
F18	5,16	5,18		5,16	5,19		5,16	5,27

Таблица 15: Измеренные концентрации белка (мг/мл) для всех композиций при различных температурах хранения в течение вплоть до 6 месяцев (измерения не проводили для композиций в условиях хранениях, которые обозначены затененными областями)

Код композиции	2-8°C			25°C			40°C	
	T0	T3	T6	T0	T3	T6	T0	T3
F1	102,8	102,9	99,5	102,8	104,0	101,7	102,8	103,0
F2	95,9	97,6	96,1	95,9	92,7	95,6	95,9	95,4
F3	100,7	101,2	100,3	100,7	103,7	101,5	100,7	105,0
F4	97,5	98,4	99,8	97,5	101,5	100,7	97,5	101,3
F5	99,2	99,4	99,5	99,2	100,2	99,5	99,2	102,0
F6	103,8	103,0	103,7	103,8	104,7	99,3	103,8	103,3
F7	100,5	100,0	100,4	100,5	97,2	103,7	100,5	100,9
F8	102,3	102,3	102,0	102,3	105,0	102,3	102,3	102,9
F9	95,2	93,6	94,6	95,2	95,7	92,6	95,2	93,8
F10	67,8	68,0		67,8	65,9		67,8	66,0
F11	9,9	9,9		9,9	9,4		9,9	9,9
F12	92,6	95,5	93,0	92,6	97,1	92,6	92,6	91,9
F13	97,4	95,6	92,6	97,4	94,4	94,2	97,4	99,5
F14	96,6	96,0		96,6	97,3		96,6	94,0
F15	95,4	95,3		95,4	100,1		95,4	99,7
F17	101,2	98,7	98,1	101,2	101,5	102,5	101,2	101,2
F18	100,3	99,8	101,9	100,3	98,5	99,7	100,3	100,0

Пример 3 – Ограниченный анализ субвидимых частиц через 6 месяцев

В большинстве изученных композиций после хранение в течение 3 месяцев при обеих температурах 5 и 25°C обнаружено небольшое количество субвидимых частиц во всех изученных диапазонах размеров частиц (см. фиг. 7).

Большое количество субвидимых частиц обнаружено в F1 (и при 5°C, и при 25°C). Это может быть связано с процессом приготовления композиции. Высокий уровень частиц может быть связан с регулированием pH, процессом введения и отсутствием диализа.

Пример 4 – Изучение агрегационного поведения (высокомолекулярные виды) с помощью гель-фильтрации в T0 и в последующий период

Все композиции 1-18 (см. таблицу 10) анализировали с помощью гель-фильтрации в отношении количества высокомолекулярных видов (растворимые агрегаты) в T0 согласно описанному выше методу.

% HMW в начальный момент времени (T0) во всех композициях представлен в таблице 17. Константы скорости агрегации наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) определяли для всех композиций

при 2-8, 25 и 40°C методом множественной линейной регрессии, описанным выше. Результаты обобщены также в таблице 16.

Профиль растворимых агрегатов в начальный момент времени (T0) для всех композиций характеризовался вариацией в % HMW. Это связано с различиями в процессе приготовления различных композиций. Например, некоторые диализаты подвергали концентрированию после диализа, а другие нет. В целом, относительно низкий % HMW обнаружен во всех композициях в T0 (в целом <1,5%). Важно отметить, что систематическое повышение уровней агрегации (% HMW) обнаружено в композициях при повышенных концентрациях белка (F2, F10, F11). Следует отметить, что эти композиции приготавливали путем разбавления из одного и того же маточного раствора диализата с использованием одного и того же буфера.

Анализ всех композиций прекращали после 3 месяцев хранения при 40°C, поскольку агрегация во всех композициях достигала уровней, достаточных для того, чтобы оценивать различия в характеристиках композиций с позиций агрегационной стабильности (от лучших к худшим). Анализ F10, F11, F14 и F15 также прекращали после 3 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C. Данные об агрегации, полученные после 3 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C для F10 и F11, были достаточными для определения влияния концентрации белка на физическую стабильность (с позиций агрегации). С другой стороны, для F14 и F15 этим методом и другими методами (которые будут обсуждены ниже) обнаружена плохая стабильность, достаточная для оправдания их исключения (из опыта). В целом, обнаружено, что % основных видов (мономер) снижался с течением времени наряду с одновременным увеличением агрегации (% HMW) и фрагментов (% LMW). Однако фрагментацию предпочтительно изучали не указанным методом, а более надежным методом оценки LMW (CGE), что будет обсуждено ниже.

Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 16, свидетельствуют о том, что скорость агрегации возрастала с повышением температуры хранения. При каждом повышении температуры на 10°C вплоть до 40°C скорость агрегации возрастала в среднем в 1,75 раза, после чего были обнаружены более значительные изменения, свидетельствующие о возможно

разном механизме агрегации молекул в условиях хранения при более высокой температуре по сравнению с более низкой температурой хранения.

Для изучения влияния типа стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F1-F7. Стабилизаторы, применяемые в композициях, представляли собой сахара /полиолы, аминокислоты или смеси аминокислот и сахаров. Эти композиции содержали фиксированные уровни всех стабилизаторов, составляющие 250мМ. Из результатов, представленных в таблице 16, следует, что молекула мультимера Fc (CSL730) в композициях на основе сахарозы и трегалозы (F2 и F3 соответственно) обладала лучшей стабильностью по сравнению во всеми другими композициями при всех температурах, о чем свидетельствуют несколько более низкие показатели скорости агрегации при 2-8°C и 25°C и существенно более низкие скорости агрегации при 40°C. Для композиции на основе сорбита обнаружена более высокая стабильность по сравнению с композициями на основе аминокислот (вне зависимости от присутствия или отсутствия сахарозы в сочетании с аминокислотами) при 40°C, но сопоставимая стабильность при более низких температурах в течение вплоть до 6 месяцев. Аналогично этому, для композиций на основе пролина обнаружена более высокая стабильность по сравнению с композициями на основе аргинина (вне зависимости от присутствия или отсутствия сахарозы) прит 40°C, но сопоставимая стабильность при более низких температурах в течение вплоть до 6 месяцев.

Для оценки влияния концентрации белка при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2, F10 и F11, в которых использовали сахарозу в качестве стабилизатора сахарного типа. Концентрация белка находилась в диапазоне от 10 до 100 мг/мл. Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 16, продемонстрировали, что молекула мультимера Fc (CSL730) отличалась высокой стабильностью при применении в очень низкой концентрации(10 мг/мл) в F11, далее в порядке убывания следовала композиция с концентрацией 70 мг/мл (F10), а далее 100 мг/мл (F2). График зависимости константы скорости агрегации от концентрации белка для всех трех композиций при всех температурах продемонстрировал нелинейное повышение скорости агрегации в зависимости от концентрации белка (результаты не представлены). Следует отметить, что при фиксированных уровнях стабилизатора молярное

соотношение стабилизатора и белка увеличивалось по мере снижения концентрации белка (таблица 10) – фактор, который может способствовать значительному повышению стабильности при хранении.

Для оценки влияния уровней стабилизатора при фиксированной (высокой) концентрации белка (100 мг/мл) сравнивали стабильность при хранении F2, F8 и F9, в которых использовали сахарозу в качестве стабилизатора сахарного типа. Уровни стабилизатора находились в диапазоне от 200 до 300мМ. Результаты, представленные в таблице 16, свидетельствуют о том, что композиция с концентрацией сахарозы 225мМ (F8) оказалась наименее стабильной из композиций на основе сахарозы по сравнению с композициями, содержащими 250мМ (F2) и 300мМ (F9), при всех температурах хранения. Для F9 обнаружено инкрементальное повышение стабильности при хранении по сравнению с F2 при всех температурах. Аналогично этому, молекула мультимера Fc (CSL730) в содержащей пролин в концентрации 200мМ композиции (F17) обладала существенно более низкой стабильностью по сравнению с содержащей пролин в концентрации 250мМ композицией при всех температурах хранения. Важно отметить, что молекула мультимера Fc (CSL730) оказалась более стабильной во всех содержащих сахарозу композициях по сравнению с содержащими пролин композициями при температуре хранения 40°C.

Для оценки влияния антиоксиданта (тип и уровень) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2, F12, F13, F14 и F15. В качестве антиоксидантов применяли метионин (10 и 20мМ) и восстановленный глутатион GSH (1 и 10мМ). Результаты, представленные в таблице 16, свидетельствуют о том, что при применении метионина в качестве антиоксиданта для молекулы мультимера Fc (CSL730) характерно инкрементальное (небольшое) улучшение стабильности (физической) при хранении при 40°C по мере увеличения уровней метионина. Однако не обнаружено значимых различий между физической стабильностью композиций с метионином и без него. Композиции, содержащие восстановленный GSH, обладали существенно большей нестабильностью при 40°C по сравнению с композицией без антиоксиданта (F2) и с метионином в качестве антиоксиданта (F12, F13). Меньшие различия в стабильности при хранении обнаружены между содержащими GSH композициями по сравнению с F2, F12 и F13 при 25°C,

однако с тем же результатом (меньшая стабильность композиций с восстановленным GSH). Несмотря на это композиции с восстановленным GSH (F14, F15) были исключены из опыта после изучения стабильности при хранении в течение 3 месяцев, поскольку данные о стабильности, полученные другими методами, показали значительную нестабильность F14 и F15, что оправдывает прекращение их изучения.

Для оценки влияния уровня поверхностно-активного вещества (PS80) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2 и F18. Изучаемые уровни PS80 составляли 0,02% (мас./об.) и 0,04% (мас./об.). Никаких значимых различий не обнаружено в стабильности при хранении (агрегация) для обеих композиций при 2-8°C и 25°C в течение вплоть до 6 месяцев. Однако молекула мультимера Fc (CSL730) оказалась более стабильной при 40°C при применении PS80 в более низкой концентрации (F2).

Таблица 16: Обобщение полученных с помощью SEC данных об агрегации (% HMW) по сравнению с начальным (T0) % HMW и о константах скорости агрегации k (± SE) при 2-8°C в течение 6 месяцев, при 25°C в течение вплоть до 6 месяцев и при 40°C в течение 3 месяцев (измерения не проводили для композиций в условиях хранениях, которые обозначены затененными областями)

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=3 месяца	$k_{2\text{-}8°C}$	$k_{25°C}$	$k_{40°C}$
F1	1,0	0,5	0,13 ± 0,02	0,36 ± 0,06	10,21 ± 0,69
F2	1,5	0,2	0,07 ± 0.00	0,31 ± 0,03	6,61 ± 0,58
F3	1,5	0,4	0,08 ± 0,03	0,34 ± 0,03	6,66 ± 0,52
F4	1,3	0,4	0,10 ± 0,02	0,36 ± 0,05	7,61 ± 0,45
F5	0,8	0,5	0,12 ± 0,03	0,34 ± 0,07	23,15 ± 2,86
F6	0,8	0,5	0,12 ± 0,03	0,36 ± 0,07	18,55 ± 2,63
F7	1,0	0,5	0,12 ± 0,03	0,35 ± 0,06	9,75 ± 0,32
F8	1,1	0,6	0,12 ± 0,05	0,37 ± 0,09	7,31 ± 0,31
F9	1,3	0,3	0,08 ± 0,01	0,31 ± 0,04	6,13 ± 0,55
F10*	1,0	0,3		0,31 ± 0,03*	5,35 ± 0,41
F11*	0,6	0		~0*	4,26 ± 1,29
F12	1,3	0,3	0,08 ± 0,01	0,31 ± 0,04	6,48 ± 0,36
F13	1,2	0,3	0,08 ± 0,01	0,29 ± 0,05	6,40 ± 0,39
F14*	1,1	0,3		0,35 ± 0,04*	7,45 ± 0,29
F15*	0,5	0,3		0,33 ± 0,02*	11,31 ± 1,81
F17	1,0	0,5	0,12 ± 0,03	0,35 ± 0,06	16,50 ± 1,16
F18	1,6	0,4	0,07 ± 0,04	0,31 ± 0,06	7,19 ± 0,26

*Анализ образцов композиций F10, F11, F14 и F15 осуществляли только вплоть до 3 месяцев. Константы скорости агрегации k (± SE) при 25°C для этих композиций рассчитывали вплоть до 3 месяцев. Константы скорости агрегации k (± SE) для всех других композиций в этой же колонке при 25°C рассчитывали вплоть до 6 месяцев.

Пример 4 – Изучение особенностей фрагментации (низкомолекулярные виды) с помощью капиллярного электрофореза в невосстанавливающих условиях (NR-cGE) в T0 и последующий период

Все композиции (см. таблицу 10) анализировали с помощью cGE в невосстанавливающих условиях, используя Caliper (NR-Caliper) для количественной оценки низкомолекулярных (LMW) видов (т.е. фрагментации), при T0, согласно описанному выше методу. Анализировали также образцы плацебо и не было обнаружено влияния ингредиентов образов плацебо (т.е неактивных ингредиентов композиции) на пики белка на cGE-хроматограммах (данные не представлены).

Измеряли % всех LMW-видов в начальный момент времени (T0) во всех композициях. F15 содержала самый высокий уровень фрагментов в T0, эти данные подтверждены также с использованием SEC (данные не представлены). Измеренный начальный (общий) % LMW-видов во всех композициях, кроме F15, находился на относительно низких уровнях, таких как от 2,1 до 2,5%.

За исключением F10 и F11, мониторинг особенностей фрагментации композиций осуществляли с помощью NR-cGE методом «Caliper» в различные моменты времени при различных температурах для отобранных композиций, поскольку этот метод представляет собой метод, обладающий относительно более высокой продуктивностью. Определяли константы скорости фрагментации наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) при различных температурах хранения методом множественной линейной регрессии, описанным выше. Результаты обобщены также в таблице 17.

Анализ всех композиций прекращали после 3 месяцев хранения при 40°C, поскольку фрагментация во всех композициях достигала уровней, достаточных для того, чтобы различать характеристики композиций с позиций стабильности в отношении фрагментации (от лучших к худшим). Анализ F14 и F15 также прекращали после хранения в течение 3 месяцев при 2-8°C и 25°C, поскольку данных о стабильности, полученных указанным методом и другими методами

(агрегация, окисление), оказалось достаточно для обоснования прекращения их изучения. В целом, с помощью SEC-анализа установлено, что % основных видов снижался со временем наряду с одновременным повышением агрегации (% HMW) и фрагментации (% LMW). Однако агрегацию предпочтительно изучать не этим методом, а методом SEC, более надежным методом определения растворимых агрегатов.

Во всех композициях, изученных при 2-8°C, с течением времени встречались небольшие колебания в фрагментации (в пределах ошибки анализа), о чем свидетельствуют очень небольшие изменения в % LMW через 3 и 6 месяцев.

Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 17, демонстрируют, что скорость фрагментации возрастала с повышением температуры хранения.

Для оценки влияния типа стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F1-F7. Представленные в таблице 17 результаты свидетельствуют о том, что для молекулы мультимера Fc (CSL730) характерна более значительная способность к фрагментации в присутствии аргинина (вне зависимости от присутствия или отсутствия сахарозы: F5 и F6) и при 25°C, и при 40°C. Для всех других композиций фрагментацию сравнивали при 25°C. При 40°C обнаружена меньшая фрагментация в содержащих сахарозу и сорбит (F2 и F4 соответственно) композициях по сравнению с содержащими пролин и трегалозу композициями (F1 и F3 соответственно), о чем свидетельствуют более низкие скорости фрагментации при 40°C.

Для оценки влияния уровней стабилизатора при фиксированной концентрации белка (100 мг/мл) сравнивали стабильность при хранении F2, F8 и F9, в которых использовали сахарозу в качестве стабилизатора сахарного типа. Уровни стабилизатора находились в диапазоне от 200 до 300мМ. Результаты, представленные в таблице 17, свидетельствуют об отсутствии больших различий в стабильности в отношении фрагментации при 25°C в зависимости от уровня сахарозы. При создании изобретения неожиданно было установлено, что композиция с сахарозой в концентрации 250мМ (F2) обладала при 40°C более высокой стабильностью в отношении фрагментации, чем соответствующие композиции с концентрациями сахарозы 225мМ и 300мМ. При применении

пролина в качестве стабилизатора молекула мультимера Fc (CSL730) в содержащей пролин в концентрации 200мМ композиции (F17), обладала при 25°C и 40°C несколько более высокой стабильностью в отношении фрагментации по сравнению с композицией с концентрацией пролина 250мМ.

Для оценки влияния антиоксиданта (тип и уровень) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2, F12, F13, F14 и F15. Результаты, представленные в таблице 17, свидетельствуют о наличии небольших различий в стабильности при хранении в отношении фрагментации молекулы мультимера Fc (CSL730) в присутствии в качестве антиоксиданта метионина при 40°C по сравнению с его отсутствием. Стабильность в отношении фрагментации оказалась несколько более высокой в отсутствии метионина при 25°C, причина этого явления пока не нашла объяснения. Более существенная нестабильность, связанная с фрагментацией, обнаружена только после хранения в течение 3 месяцев и при 25°C, и при 40°C в композициях, содержащих восстановленный GSH. Таким образом, прекращено изучение содержащих восстановленный GSH композиций (F14, F15) после 3 месяцев хранения, поскольку данные о стабильности, полученные с помощью этого метода и других методов, показали значимую нестабильность F14 и F15, что оправдывает их исключение (из опыта).

Для оценки влияния уровня поверхностно-активного вещества (PS80) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2 (0,02% (мас./об.) PS80) и F18 (0,04% (мас./об.) PS80). Никаких различий не обнаружено в стабильности при хранении (фрагментация) для обеих композиций при 25°C вплоть до 6 месяцев. Однако молекула мультимера Fc (CSL730) оказалась более стабильной при 40°C при более низкой концентрации PS80 (F2).

Таблица 17: Обобщение данных, полученных с помощью NR-cGE методом «Caliper», о фрагментации (% LMW) в сравнении с начальным (T0) % LMW, изменениях фрагментации при 2-8°C через 3 и 6 месяцев, и константах скорости фрагментации k (± SE) при 25°C после хранения в течение 6 месяцев и при 40°C после хранения в течение 3 месяцев (измерения не проводили для композиций в условиях хранениях, которые обозначены затененными областями)

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=3 месяца	Δ при 2-8°C после T=6 месяцев	$K_{25°C}$	$K_{40°C}$
F1	2,4	0,2	0,0	0,46 ± 0,08	4,21 ± 0,14
F2	2,2	0,4	0,2	0,48 ± 0,07	3,79 ± 0,12
F3	2,3	0,4	0,2	0,47 ± 0,06	4,70 ± 0,53
F4	2,3	0,3	0,2	0,41 ± 0,07	3,88 ± 0,10
F5	2,3	0,4	0,3	0,56 ± 0,04	4,98 ± 0,13
F6	2,3	0,5	0,5	0,59 ± 0,07	5,02 ± 0,23
F7	2,5	0,2	0,5	0,48 ± 0,07	4,09 ± 0,13
F8	2,3	0,3	0,7	0,49 ± 0,07	4,27 ± 0,19
F9	2,3	0,2	0,2	0,50 ± 0,07	4,22 ± 0,29
F12	2,3	0,3	0,0	0,44 ± 0,09	4,12 ± 0,25
F13	2,3	0,5	0,7	0,51 ± 0,08	4,15 ± 0,18
F14	2,3	0,4		0,90 ± 0,09*	4,41 ± 0,21
F15	4,2	0,0		0,60 ± 0,36*	5,07 ± 0,28
F17	2,1	0,4	0,2	0,57 ± 0,11	4,49 ± 0,24
F18	2,2	0,4	0,8	0,48 ± 0,11	4,21 ± 0,08

* Константы скорости при 25°C для F14 и F15 базируются на данных, полученных при хранении вплоть до 3 месяцев.

Пример 5 – Изучение кислотных и щелочных видов с помощью катиообменной хроматографии (CEX) в момент времени T0 и последующий период

Все композиции (см. таблицу 10) анализировали с помощью CEX в отношении количества (%) кислотных видов и щелочных видов в T0, согласно описанному выше методу. Анализировали также с помощью CEX образцы плацебо и не было обнаружено влияния ингредиентов плацебо (т.е неактивных ингредиентов композиции) на пики белка на CEX-хроматограммах (данные не представлены).

На фиг. 8 представлено сравнение результатов (T0) определения % кислотных и щелочных видов во всех композициях. Для большинства композиций % кислотных видов в T0 оказались сопоставимым. Начальные уровни % кислотных видов в F15 (с высокими уровнями восстановленного GSH) и F17 (с пониженными уровнями пролина) оказались ~ на 2,5-3,5% ниже, чем в

других композициях (см. также таблицу 9). Аналогично этому, % щелочных видов в момент времени T0 для большинства композиций оказались сопоставимыми (~4-5%). Однако в F15 обнаружены самые высокие исходные уровни % щелочных видов (6,1%) по сравнению с другими композициями.

Мониторинг % кислотных видов во всех композициях осуществляли с помощью метода CEX в течение времени при различных температурах. Константы скорости образования кислотных видов наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) определяли при различных температурах хранения методом множественной линейной регрессии, описанным выше. Результаты обобщены также в таблице 18.

Анализ всех композиций прекращали после 2 месяцев хранения при 40°C, поскольку уровни кислотных видов во всех композициях оказались различными и достаточно высокими для того, чтобы различать характеристики композиций с позиций стабильности в отношении кислотных видов (от лучших к худшим). Анализ F10, F11, F14 и F15 также прекращали после хранения в течение 3 месяца при 2-8°C и 25°C. Для F14 и F15 этим методом и другими методами обнаружена плохая стабильность, что являлось достаточным для оправдания их исключение (из опыта). В целом, установлено, что % основных видов снижался со временем наряду с одновременным повышением % щелочных видов и более значительным повышением % кислотных видов.

Для F15 обнаружено значимое повышение процента % кислотных видов лишь после хранения в течение 3 месяцев при 2-8°C, далее в порядке повышения % следовала F17. Небольшие колебания % кислотных видов (в пределах погрешности эксперимента) обнаружены в других композициях при одинаковой температуре. При продолжении хранения композиций при 2-8°C после 3 месяцев в этих композициях обнаружены небольшие флуктуации % кислотных видов. Среди этих композиций в F17 по-прежнему обнаружены более высокие уровни % кислотных видов после 6 месяцев хранения при 2-8 °C (таблица 18).

Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 18, свидетельствуют о том, что скорость образования кислотных видов возрастала с повышением температуры хранения.

Для оценки влияния типа стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F1-F7. Представленные в таблице 18 результаты свидетельствуют о

том, что молекула мультимера Fc (CSL730) неожиданно отличалась более высокой стабильностью в отношении скорости образования кислотных видов в присутствии аргинина (F5 и F6) и при 25°C, и при 40°C (в отличие от тенденций стабильности в отношении фрагментации и агрегации).

Для оценки влияния концентрации белка при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2, F10 и F11, содержащих сахарозу в качестве стабилизатора сахарного типа. Результаты, представленные в таблице 18, свидетельствуют о том, что для молекулы мультимера Fc (CSL730) характерны небольшие различия в стабильности в отношении образования кислотных видов в трех композициях с различными концентрациями белка и при 25°C, и при 40°C.

Для оценки влияния уровней стабилизатора при фиксированной концентрации белка (100 мг/мл) сравнивали стабильность при хранении F2, F8 и F9, содержащих сахарозу в качестве стабилизатора сахарного типа. Уровни стабилизатора составляли от 200 до 300мМ. Результаты, представленные в таблице 18, свидетельствуют о том, что для молекулы мультимера Fc (CSL730) характерны небольшие различия в стабильности в отношении образования кислотных видов в трех композициях с различными уровнями сахарозы и при 25°C, и при 40°C. Несмотря на начальные более высокие уровни % кислотых видов в F17, молекула мультимера Fc (CSL730) в содержащей пролин в концентрации 200мМ композиции (F17) обладала сопоставимой стабильностью в отношении образования кислотных видов с композицией, содержащей пролин в концентрации 250мМ, и при 25°C, и при 40 °C. В целом, стабильность молекулы мультимера Fc (CSL730) в отношении образования кислотных видов в композициях, содержащих сахарозу и пролин, оказалась сопоставимой и при 25°C, и при 40°C.

Для оценки влияния антиоксиданта (типа и уровня) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2, F12, F13, F14 и F15. Результаты, представленные в таблице 18, свидетельствуют о том, что для молекулы мультимера Fc (CSL730) характерны небольшие различия в стабильности в отношении образования кислотных видов в присутствии метионина в качестве антиоксиданта по сравнению с его отсутствием и при 25°C, и при 40°C. Аналогично результатам, полученным при изучении

стабильности в отношениии агрегации и фрагментации, обнаружена более выраженная нестабильность, связанная с образованием кислотных видов, композиций, содержащих восстановленный GSH. Систематическое увеличение константы скорости образования кислотных видов по мере увеличения содержания восстановленного GSH обнаружено вплоть до 3 месяцев при 25°C и 2 месяцев при 40°C. В результате содержащие восстановленный GSH композиции (F14, F15) исключали (из опыта) после изучения стабильности при хранении в течение 3 месяцев, поскольку данные о стабильности, полученные этим методом и другими методами, свидетельствуют о нестабильности F14 и F15, достаточной для оправдания их исключения.

Для оценки влияния уровня поверхностно-активного вещества (PS80) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2 (0,02% (мас./об.) PS80) и F18 (0,04% (мас./об.) PS80). Обнаружены небольшие различия в стабильности при хранении (образование кислотных видов) для обеих композиций и при 25°C, и при 40°C.

Таблица 18: Обобщение данных, полученных с помощью CEX, о % кислотных видов в сравнении с начальным (T0) % кислотных видов, изменениях % кислотных видов при 2-8°C через 3 и 6 месяцев, и константах скорости образования кислотных видов k (± SE) при 25°C после хранения в течение 6 месяцев и при 40°C после хранения в течение 2 месяцев (измерения не проводили для композиций в условиях хранениях, которые обозначены затененными областями)

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=3 месяца	Δ при 2-8°C после T=6 месяцев	$k_{25°C}$	$K_{40°C}$
F1	57,3	0,1	0,4	1,59 ± 0,17	11,35 ± 1,30
F2	57,5	0,4	0,7	1,66 ± 0,15	12,35 ± 1,53
F3	57,7	0,3	0,3	1,59 ± 0,20	11,75 ± 1,53
F4	57,6	0,5	0,5	1,56 ± 0,11	11,45 ± 1,59
F5	57,5	0,0	0,0	0,90 ± 0,17	8,25 ± 0,49
F6	57,7	0,0	0,0	0,97 ± 0,25	7,80 ± 0,87
F7	57,5	0,0	0,1	1,49 ± 0,18	10,85 ± 1,36
F8	57,6	0,3	0,6	1,58 ± 0,17	10,95 ± 2,05
F9	57,9	0,1	0,3	1,57 ± 0,17	11,55 ± 1,18
F10	58,0	0,1		1,42 ± 0,39*	12,35 ± 1,24
F11	57,8	0,6		1,67 ± 0,29*	12,00 ± 1,56
F12	57,6	0,0	0,6	1,59 ± 0,13	11,70 ± 1,79
F13	57,6	0,1	0,9	1,62 ± 0,12	12,25 ± 1,13
F14	57,6	0,7		1,71 ± 0,16*	12,25 ± 1,65
F15	54,6	5,9		3,31 ± 0,93*	13,40 ± 3,87
F17	55,4	1,6	2,1	1,69 ± 0,05	11,95 ± 1,88

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=3 месяца	Δ при 2-8°C после T=6 месяцев	$k_{25°C}$	$K_{40°C}$
F18	57,5	0,1	0,3	1,50 ± 0,04	12,15 ± 1,36

* Константы скорости при 25°C для F10, F11, F14 и F15 базируются на данных, полученных при хранении вплоть до 3 месяцев

Пример 6 – Изучение особенностей окисления с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) в T0 и последующий период

Все композиции (см. таблицу 10) количественно анализировали с помощью RP-HPLC в отношении общего % окисления и % окисления в длинной цепи (LC) и короткой цепи (SC) при T0, согласно описанному выше методу. На фиг. 9 представлены репрезентативные хроматограммы профиля окисления молекулы мультимера Fc (CSL730) в образце композиции. На фиг. 9 продемонстрировано, что происходит элюция окисленных SC-видов, затем элюция SC, после чего происходит элюция окисленных LC-видов и затем LC. Хроматографический профиль содержит также SC- и LC- фрагменты, а также N-третичный пируват SC и LC. Анализировали также с помощью метода RP-HPLC образцы плацебо, и не было обнаружено влияния ингредиентов плацебо (т.е. неактивных ингредиентов композиции) на пики белка на хроматограммах (данные не представлены). Особенно важным являлся анализ композиций с восстановленным GSH.

На фиг. 10 представлен сравнительный анализ результатов, полученных в начальный момент времени (T0), касающихся % окисленных SC-видов, % окисленных LC-видов и относительной площади (%) полного окисления для всех композиций. В момент времени T0 % кислотных видов для большинства композиций оказался сопоставимым. Начальные уровни % окисленных SC-видов, % окисленных LC-видов и относительной площади (%) полного окисления для большинства композиций оказались сопоставимыми. С другой стороны, более высокие уровни окисления обнаружены для всех измеряемых показателей в композициях с восстановленным GSH (F14 и F15) (см. также таблицу 19). % окисленных видов (SC и LC) и общий % окисления возрастал в T0 с увеличением уровней восстановленного GSH.

С помощью метода RP-HPLC осуществляли мониторинг % окисленных SC-видов, % окисленных LC-видов и относительной площади (%) полного

окисления во всех композициях в течение времени при различных температурах. Константы скорости общего окисления наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) определяли при различных температурах хранения методом множественной линейной регрессии, описанным выше. Результаты обобщены также в таблице 19.

Несколько отобранных композиций анализировали в течение вплоть до 6 месяцев при 2-8°C и при 25 °C. Анализ окисления некоторых композиций прекращали уже через 2 месяца хранения при 25°C (основываясь на их показателях при 40°C). Анализ всех композиций прекращали после 2 месяцев хранения при 40°C, поскольку окисление достигало уровней, достаточно высоких, для того, чтобы идентифицировать и удалить композиции с наихудшими показателями. В целом, установлено, что % неокисленных SC и % неокисленных LC снижался со временем наряду с одновременным увеличением % окисленных SC-видов и % окисленных LC-видов. В целом, общий % окисления в различных композициях увеличивался в различной степени в зависимости от времени и температуры, что продемонстрировано на фиг. 11.

В таблице 19 продемонстрировано, что для композиций, в которых оценивали окисление после хранения в течение 6 месяцев при 2-8°C, установлено небольшое увеличение общего % окисления. При этом, в композиции, содержащей аргинин в качестве основного стабилизатора (F5), обнаружено самое сильное окисление после хранения в течение 6 месяцев, в композиции F14 и F15 не были включены в опыт при 2-8°C.

Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 19, свидетельствуют о том, что скорость окисления возрастала при увеличении температуры хранения. В частности, увеличение скорости окисления при 25°C и 40°C оказалось очень небольшим в присутствии 10мМ восстановленного GSH (F15). Возможно, это может указывать на то, что при высоких уровнях GSH в исследуемой системе (F15) окисление начинало в меньшей степени зависеть от температуры и в большей степени определялось концентрацией GSH, что приводило к изменению кинетики окисления.

Для оценки влияния типа стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F1-F7. Результаты, представленные в таблице 19, свидетельствуют о том, что молекула мультимера Fc (CSL730) отличалась большей стабильностью

в отношении окисления в присутствии полиолов/сахаров при 25°C по сравнению с присутствием аминокислот. Однако результаты, полученные при 40°C, не согласовывались с результатами, полученными при 25°C. Таким образом, на основе полученных результатов нельзя сделать вывод о какой-либо тенденции. Учитывая вариабельность анализов измеренных уровней окисления, различия между композициями можно считать небольшими.

Для оценки влияния концентрации белка при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2, F10 и F11, которые содержали сахарозу в качестве стабилизатора сахарного типа. Результаты, представленные в таблице 19, свидетельствуют о том, что молекула мультимера Fc (CSL730) отличалась большей стабильностью в отношении окисления с повышением концентрации белка и при 25°C, и при 40°C. Это наиболее четко продемонстрировано при 40°C при сравнении стабильности композиции с концентрацией белка 10 мг/мл (F11) с композициями с концентрациями белка 100 мг/мл и 70 мг/мл (F2 и F10 соответственно). F2 и F10 оказались в 2,4-2,8 раза более стабильными, чем F11 при 40°C.

Для оценки влияния уровней стабилизатора при фиксированной концентрации белка (100 мг/мл) сравнивали стабильность при хранении F2, F8 и F9, которые содержали сахарозу в качестве стабилизатора сахарного типа. Уровни стабилизатора составляли от 200 до 300мМ. Результаты, представленные в таблице 19, свидетельствуют о том, что для молекулы мультимера Fc (CSL730) характерны небольшие различия в стабильности в отношении окисления между тремя композициями с различными уровнями сахарозы и при 25°C, и при 40°C. Такой же результат получен в присутствии пролина в качестве стабилизатора в концентрации 200мМ и 250мМ и при 25°C, и при 40°C.

Для оценки влияния антиоксиданта (тип и уровень) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2, F12, F13, F14 и F15. Результаты, представленные в таблице 19, свидетельствуют о небольшом, но систематическом улучшении стабильности в отношении окисления при повышении уровней метионина при 25°C (F12 и F13) по сравнению с его отсутствием. Систематическое, но более значимое улучшение стабильности в отношении окисления обнаружено при 40°C при повышении уровней метионина. Композиции, содержащие восстановленный GSH, отличались наихудшей

стабильностью в отношении окисления, в противоположность композициям, содержащим метионин (или даже другим композициям без антиоксидантов) (см. также фиг. 11). Нелинейное повышение константы скорости окисления при увеличении содержания восстановленного GSH обнаружено при хранении вплоть до 2 месяцев и при 25°C, и при 40°C. При обеих температурах присутствие всего лишь 1мМ GSH приводило к увеличенному в 4,7-9,3 раза окислению по сравнению с эквивалентными композициями с метионином и при 25°C, и при 40°C. В результате (как и при применении других методов, рассмотренных выше), изучение композиций, содержащих восстановленный GSH (F14, F15), прекращали уже через 2 месяца на основе стабильности при хранении в отношении окисления.

Для оценки влияния уровня поверхностно-активного вещества (PS80) при фиксированном уровне стабилизатора сравнивали стабильность при хранении F2 (0,02% (мас./об.) PS80) и F18 (0,04% (мас./об.) PS80). Не обнаружено никаких поддающихся измерению различий в стабильности при хранении (в отношении окисления) между обеими композициями при 40°C.

Таблица 19: Обобщение данных, полученных с помощью RP-HPLC, об относительной площади(%) общего оксиления в сравнении с начальным (T0), изменениях % общего оксиления при 2-8°C через 6 месяцев, и константах скорости окисления k (± SE) при 25°C после хранения в течение вплоть до 6 месяцев и при 40°C после хранения в течение 2 месяцев (измерения не проводили для композиций в условиях хранениях, которые обозначены затененными областями)

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=6 месяцев	$k_{25°C}$	$k_{40°C}$
F1	8,1	0,8	0,43 ± 0,09	2,00 ± 0,12
F2	7,9	1,2	0,52 ± 0,08	2,50 ± 0,35
F3	8,0	1,2	0,49 ± 0,09	1,85 ± 0,09
F4	8,0	0,8	0,52 ± 0,21	1,65 ± 0,09
F5	8,2	2,4	0,78 ± 0,06	2,10 ± 0,00
F6	7,9		0,60 ± 0,17*	2,60 ± 0,12
F7	8,0		1,20 ± 0,46*	1,75 ± 0,03
F8	7,7			2,05 ± 0,14
F9	7,6	1,1	0,59 ± 0,11	2,25 ± 0,09
F10	7,9		1,05 ± 0,26*	2,20 ± 0,06
F11	7,7			6,05 ± 1,88
F12	7,6	1,0	0,28 ± 0,03	0,55 ± 0,09
F13	7,6		0,55 ± 0,32*	0,40 ± 0,06
F14	8,9		2,60 ± 0,92*	3,75 ± 1,18

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=6 месяцев	$k_{25°C}$	$k_{40°C}$
F15	10,7		9,25 ± 1,76*	9,75 ± 4,47
F17	7,8	1,2	0,49 ± 0,07	2,10 ± 0,00
F18	7,9			2,30 ± 0,06

* Константы скорости при 25°C базируются на данных, полученных при хранении в течение вплоть до 2 месяцев

Выводы по результатам, описанным в разделе 2

- Можно получать композицию стабильного жидкого лекарственного препарата (DP) CSL730 с высокой концентрацией (≥100 мг/мл),
- которая является стабильной в отношении агрегации, образования кислотных видов, фрагментации и окисления.
- Факторами, участвующими в стабилизации молекул мультимеров Fc, прежде всего при высоких концентрациях белка, являются
  - более низкие значения pH (5-5,8),
  - применение дисахаридов/полиолов в качестве стабилизаторов и в меньшей степени аминокислот,
  - оптимальным для стабильности белка является молярное соотношение белок-сахароза 1:420. Можно также достигать стабильности при более низких соотношениях белок-сахароза. Надежность композиции повышается при превышении этого соотношения.
- Антиоксиданты могут требоваться для предотвращения пожелтения и/или побочных реакций окисления в процессе хранения, что может быть связано с другими эксципиентами, или для защиты от специфических производственных условий (например, воздействия света, воздействия испаряющейся перекиси водорода, оставшейся после стерилизации разливочных машин, в изолированных помещениях) или необычных условий обращения при клиническом применении.
- Более высокие уровни PS80 могут требоваться для стабильности при хранении, а также могут требоваться для обеспечения стабильности во время производства и клинического обращения/введения.

Раздел 3 – Скрининговое исследование стабилизаторов при концентрации белка 120-160 мг/мл

После скрининговых исследований эксципиентов осуществляли исследование для изучения влияния типа стабилизатора (на основе результатов, описанных в разделе 2, рассматривали следующие представляющие интерес стабилизаторы: сахарозу, трегалозу и пролин) в присутствии 20мМ гистидина, 0,02% (мас./об.) полисорбата 80 и 10мМ метионина на жидкие композиции, содержащие молекулу мультимера Fc, (CSL730) при высокой концентрации белка. Концентрацию белка варьировали, но молярное соотношение белка и стабилизатора фиксировали на уровне примерно 1:420. Значение pH всех композиций фиксировали на уровне 5,25 ± 0,1. В целом, приготавливали и исследовали на стабильность белка композиции CSL730 с концентрацией белка в диапазоне 120-160 мг/мл. Данные о приготовленных для настоящего исследования композициях обобщены в таблице 20.

Таблица 20: Краткое описание композиций, приготовленных для последующего исследования при более высоких концентрациях белка

Композиция №	Целевая концентрация CSL730 (мг/мл)	Целевая концентрация PS80 (% мас./об)	Целевое значение pH	Тип стабилизатора	Концентрация стабилизатора (мМ)	Тип и концентрация антиоксиданта (мМ)	Молярное соотношение (белок:стабилизатор)
F1	120 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	305	10мМ метионин	1:417
F2	160 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Сахароза	380	10мМ метионин	1:417
F3	120 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Трегалоза	305	10мМ метионин	1:417
F4	160 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Трегалоза	380	10мМ метионин	1:417
F5	120 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Пролин	305	10мМ метионин	1:417
F6	160 ± 5	0,02	5,25 ± 0,1	Пролин	305	10мМ метионин	1:417

Методы, применяемые для анализа стабильности композиций:

Для анализа композиций в различные моменты времени применяли методы, пригодные для оценки стабильности, а именно: гель-фильтрацию (SEC), катионообменную хроматографию (CEX), капиллярный гель-электрофорез (CGE) (Caliper) и для анализа окисления HPLC с обращенной фазой (RP-HPLC). Кроме того, в различные моменты времени осуществляли мониторинг значения pH, внешнего вида (цвет, мутность и видимые частицы) и субвидимых частиц (SVP) композиций.

Методы, применяемые для исследования и цель, для которой применяли каждый метод, обобщены в таблице 21. Условия хранения и моменты времени, в которые проводили каждый анализ, обобщены в таблице 22.

Таблица 21: Аналитические методы, применяемые для исследований стабильности композиций, и их цель

Метод	Цель
Визуальное обследование	Видимые частицы, цвет, опалесценция, мутность
Анализ частиц с динамической визуализацией (DIPA)	Количество субвидимых частиц
Измерение pH	Анализ pH
Осмолярность	Измерение осмолярности
Тестирование полисорбата 80 (PS80)	Количественная оценка PS80
УФ-спектроскопия	Содержание белка (A280)
Гель-фильтрация (SEC)	Высокомолекулярные виды (растворимые агрегаты)
Катионообменная хроматография (CEX)	Кислотные, щелочные и основные виды
Капиллярный гель-электрофорез (CGE) (Caliper)	Низкомолекулярные виды
Высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой (RP-HPLC)	Количественная оценка окисления

Таблица 22: Краткое описание условий хранения и моментов времени проведения анализа

Условия хранения	Моменты времени
2-8°C	0, 1, 3, 6, 9, 12 месяцев
25°C	0, 1, 2, 3, 6, 9, 12 месяцев
40°C	0, 1, 2, 3, 6 месяцев

Аналитические методы применяли как описано выше в разделе 1 и разделе 2.

Пример 1 – Визуальное обследование в момент времени T0 и в последующий период

Все заполненные флаконы обследовали в отношении внешнего вида после заполнения/завершения процесса (визуальное обследование 100% образцов) два инспектора (Insp 1 и Insp 2, как указано выше) и в каждый момент времени и при каждой температуре. В целом оценки инспекторов согласовались друг с другом большинстве случаев.

Все композиции имели коричнево-желтый (BY) цвет со слабой опалесценцией, связанной с высокой концентрацией белка. В некоторых композициях и в плацебо случайно обнаружено 0-1 видимая частица. Тщательное изучение, с учетом знаний о белке, показало, что видимые частицы были экзогенными по своей природе (вероятно, были внесены в процессе заполнения/завершения процесса). Вследствие высокой вязкости ни в одной из композиций не было выявлено гелеобразования.

Композиции 1-6 (см. таблицу 20) визуально обследовали в течение вплоть до 12 месяцев при различных температурах. Цвет всех композиций не изменялся при всех температурах хранения по сравнению с цветом при T0 (BY). Прозрачность не изменялась (слабая опалесценция). Количество частиц не изменялось относительно T0 (0-1) вне зависимости от температуры и периода хранения. Ни в одной из композиций не происходило гелеобразование в течение периода хранения при любой температуре.

Пример 2 – Осмолярность, pH, концентрация белка и полисорбата 80, измеренные в T0 и в последующий период

Измерения осмолярности, pH, концентрации белка и концентрации полисорбата 80 (PS80) во всех композициях 1-6 (см. таблицу 20) проводили в начальный момент времени (T0). Результаты обобщены в таблице 23.

Представленные в таблице 23 результаты свидетельствуют о том, что концентрация белка находилась в пределах 120 ± 5 мг/мл для F1, F3 и F5 и что концентрация белка находилась в пределах 160 ± 5 мг/мл для F2, F4 и F6. Измерения pH продемонстрировали, что измеренные значения pH для большинства композиций находились в пределах ± 0,1 единицы pH по сравнению с целевыми значениями pH. Несколько более высокое отклонение в величине pH было выявлено для F6 (в пределах 0,17 единиц). Осмолярность, как правило, находилась в пределах 382-414 мОсм/кг для композиций с концентрацией 120 мг/мл, в то время как для композиций с концентрацией 160 мг/мл осмолярность была, как правило, выше (529-551 мОсм/кг). Концентрации PS80 во всех композициях находились максимум в пределах ± 0,003% (мас./об.) относительно целевых концентраций PS80.

Осуществляли мониторинг pH и концентраций белка в композициях 1-6 (см. таблицу 20) при 2-8, 25 и 40°C в течение вплоть до 12 месяцев. В пределах погрешности эксперимента результаты показали минимальные сдвиги (в пределах максимум ± 0,1 единицы) в значениях pH при всех температурах для всех композиций в пределах изучаемого периода времени. Также в пределах погрешности эксперимента результаты показали небольшие сдвиги в концентрации белка с течением времени.

Таблица 23: Измеренные концентрация белка, pH, осмолярности и концентрации полисорбата 80 (PS80) во всех композициях в начальный момент времени (T0)

Код композиции	Целевая концентрация белка (мг/мл)	Измеренная концентрация белка (мг/мл)	Целевое значение pH	Измеренное значение pH	Измеренная осмолярность (мОсм/кг)	Концентрация PS80 (% (мас./об.))
F1	120	122	5,25	5,26	414	0,018
F2	160	160	5,25	5,30	551	0,017
F3	120	124	5,25	5,33	403	TBD
F4	160	159	5,25	5,38	549	0,017
F5	120	121	5,25	5,36	382	0,021
F6	160	159	5,25	5,42	529	0,019

Пример 3 – Изучение агрегационного поведения (высокомолекулярные виды) с помощью гель-фильтрации в T0 и в последующий период

Все композиции 1-6 (см. таблицу 20) анализировали с помощью гель-фильтрации в отношении количества высокомолекулярных видов (растворимые агрегаты) в момент времени T0 согласно описанному выше методу.

% HMW в начальный момент времени (T0) во всех композициях представлен в таблице 24. Константы скорости агрегации наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) определяли для всех композиций при 2-8, 25 и 35°C методом множественной линейной регрессии, описанным выше. Результаты обобщены также в таблице 24.

Как продемонстрировано в таблице 24, в начальный момент времени (T0) уровни растворимых агрегатов (% HMW) были сопоставимыми и низкими (в пределах 0,8-1% HMW) несмотря на высокие концентрации белка.

Анализ всех композиций проводили в течение периода хранения вплоть до 12 месяцев при 2-8 °C, 25°C и вплоть до 6 месяцев при 35°C. Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 24, свидетельствуют о том, что скорость агрегации возрастала с увеличением температуры хранения. В диапазоне температур, при которых проводили исследование стабильности, при каждом увеличении температуры на 10°C происходило увеличение скорости агрегации вплоть до 2 раз.

Стабильность молекулы мономера Fc (CSL730) при более высокой концентрации белка (160 мг/мл) была в среднем в 1,3 раза ниже при 2-8°C, 25°C и 35°C по сравнению со стабильностью такой же композиции с более низкой концентрацией белка (120 мг/мл).

Все стабилизаторы при фиксированном соотношении 1:420 в течение вплоть до 3 месяцев, по-видимому, действовали сходным образом в отношении стабилизации молекулы мультимера Fc (CSL730) при всех исследованных температурах. Это было подтверждено также в течение вплоть до 12 месяцев.

Таблица 24a: Обобщение полученных с помощью SEC данных об агрегации (% HMW) по сравнению с начальным (T0) % HMW и константах скорости агрегации k (± SE) при 2-8°C, 25°C и при 35°C в течение 3 месяцев

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=3 месяца	$k_{2\text{-}8°C}$	$k_{25°C}$	$k_{40°C}$
F1	0,8	0,7	0,06 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,30 ± 0,05
F2	0,9	0,8	0,06 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,40 ± 0,07
F3	0,9	0,7	0,05 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,30 ± 0,05
F4	1,0	0,9	0,06 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,40 ± 0,10
F5	0,8	0,7	0,06 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,27 ± 0,05
F6	0,9	0,9	0,07 ± 0,02	0,20 ± 0,04	0,36 ± 0,08

Таблица 24б: Обобщение полученных с помощью SEC данных об агрегации (% HMW) по сравнению с начальным (T0) % HMW и константах скорости агрегации k (± SE) при 2-8°C и 25°C в течение 12 месяцев и при 35°C в течение вплоть до 6 месяцев

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C после T=12 месяцев	$k_{2\text{-}8°C}$	$k_{25°C}$	$K_{35°C}$
F1	0,8	1,86	0,15 ± 0,01	0,30 ± 0,04	0,98 ± 0,10
F2	0,9	2,07	0,17 ± 0,02	0,40 ± 0,05	1,59 ± 0,28
F3	0,9	1,79	0,14 ± 0,011	0,31 ± 0,04	0,97 ± 0,11
F4	1,0	2,37	0,19 ± 0,01	0,39 ± 0,06	(2,45 ± 0,14)*
F5	0,8	1,79	0,15 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,94 ± 0,10
F6	0,9	2,40	0,19 ± 0,02	0,36 ± 0,05	1,14 ± 0,15

* оценка скорости не является репрезентативной. Недостаточно доступных образцов для анализа в моменты времени >2 месяцев

Композиции с F1 по F6 все обладали хорошей стабильностью по меньшей мере в течение 12 месяцев. При 4°C все 6 композиций содержали менее 3,5% HMW-видов после 12 месяцев; при 25°C все 6 композиций содержали менее 6,5% HMW-видов.

Пример 4 – Изучение особенностей фрагментации (низкомолекулярные виды) с помощью капиллярного электрофореза в невосстанавливающих усиловиях (NR-cGE) в T0 и последующий период

Все композиции (см. таблицу 20) анализировали с помощью cGE в невосстанавливающих условиях, используя Caliper (NR-Caliper) для количественной оценки низкомолекулярных (LMW) видов (т.е. фрагментации), при T0, согласно описанному выше методу.

Начальные (T0) % LMW-видов для всех композиций представлены в таблице 25. Как представлено в таблице 25, проценты LMW в момент времени T0 для всех композиций были сопоставимыми. Такой же результат был получен для LMW-видов на основе измерений методом SEC в момент времени T0 (измеренные % LMW во всех композициях находились в пределах 2,6-2,7 %).

Мониторинг % LMW-видов для всех композиций осуществляли с помощью метода NR-cGE «Caliper» при различных температурах в течение периода времени, который сначала составлял 3 месяца, но в настоящее время продолжается уже в течение 12 месяцев. Определяли константы скорости фрагментации наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) при

различных температурах хранения методом множественной линейной регрессии, описанным выше. Результаты обобщены также в таблице 25.

Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 25, свидетельствуют о том, что скорость фрагментации возрастала с повышением температуры хранения. Во всех композициях, изученных при 2-8°C, с течением времени встречались небольшие колебания в фрагментации (в пределах ошибки анализа), о чем свидетельствуют очень небольшие изменения в % LMW в течение вплоть до 12 месяцев. Однако, при увеличении температуры хранения на 10°C (с 25°C до 35°C) скорость фрагментации возрастала в среднем в 3,6-4 раза вне зависимости от концентрации белка. Сходный результат был получен при измерении скорости фрагментации методом SEC (результаты не представлены). Согласно данным, полученным методом SEC, скорость фрагментации возрастала в среднем в 3,5 раза при увеличении температуры хранения на 10°C (с 25°C до 35°C).

При одной и той же температуре хранения не было обнаружено различий в стабильности молекулы мультимера Fc (CSL730) при более высокой концентрации белка (160 мг/мл) по сравнению с той же самой композицией с более низкой концентрацией белка (120 мг/мл). Это означает, что отсутствовали значимые различия в стабильности композиций как при 25°C, так и при 35°C в зависимости от концентрация белка. Такой же результат был получен при измерении LMW методом SEC (результаты не представлены).

Все стабилизаторы при фиксированном молярном соотношении 1:420 в течение периода времени вплоть до 12 месяцев, по-видимому, оказывали сходное влияние на стабилизацию молекулы мультимера Fc (CSL730) в отношении фрагментации при 2-8°C, 25°C и 35°C.

Таблица 25a: Обобщение полученных с помощью NR-cGE методом «Caliper» данных о фрагментации (% LMW) в сравнении с начальным (T0) % LMW, изменениях фрагментации при 2-8°C через 3 месяца и константах скорости фрагментации k (± SE) после хранения при 25°C и при 35°C в течение 3 месяцев

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C через T=3 месяца	$k_{25°C}$ (T=3 месяца)	$K_{35°C}$ (T= 3 месяца)
F1	2,8	0,3	0,12 ± 0,01	0,36 ± 0,04
F2	2,8	0,5	0,12 ± 0,01	0,40 ± 0,01
F3	2,8	0,3	0,12 ± 0,04	0,40 ± 0,02

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C через T=3 месяца	$k_{25°C}$ (T=3 месяца)	$K_{35°C}$ (T= 3 месяца)
F4	2,8	0,2	0,13 ± 0,04	0,40 ± 0,01
F5	2,8	0,5	0,11 ± 0,04	0,42 ± 0,03
F6	2,7	0,2	0,12 ± 0,04	0,41 ± 0,01

Таблица 25б: Обобщение полученных с помощью NR-cGE методом «Caliper» данных о фрагментации (% LMW) в сравнении с начальным (T0) % LMW и константах скорости фрагментации k (± SE) после хранения при 2-8°C и 25°C в течение 12 месяцев и при 35°C в течение вплоть до 6 месяцев

Код композиции	T0	Δ при 2-8°C через T=12 месяцев	$k_{2-8°C}$	$k_{25°C}$	$K_{35°C}$
F1	2,8	0,4	≤0,05	0,48 ± 0,03	1,74 ± 0,12
F2	2,8	0,2	≤0,05	0,45 ± 0,04	1,60 ± 0,03
F3	2,8	0,2	≤0,05	0,43 ± 0,03	1,74 ± 0,06
F4	2,8	0,4	≤0,05	0,41 ± 0,03	(2,40 ± 0,40)*
F5	2,8	0,2	≤0,05	0,44 ± 0,03	1,74 ± 0,05
F6	2,7	0,3	≤0,05	0,46 ± 0,03	1,83 ± 0,06

* оценка скорости не является репрезентативной. Недостаточно доступных образцов для анализа в моменты времени >2 месяцев

Пример 5 – Изучение кислотных и щелочных видов с помощью катиообменной хроматографии (CEX) в момент времени T0 и последующий период

Все композиции (см. таблицу 20) анализировали с помощью CEX в отношении количества (%) кислотных видов и щелочных видов в момент времени T0, согласно описанному выше методу.

Начальные (T0) % кислотных видов для всех композиций представлены в таблице 26. Как продемонстрировано в таблице 26, проценты кислотных видов в момент времени T0 для всех композиций оказались сопоставимыми. Аналогично этому, % щелочных видов в момент времени T0 для всех композиций также оказались сопоставимыми (3,5-3,7 %).

Мониторинг % кислотных видов во всех композициях осуществляли с помощью метода CEX в течение времени (вплоть до 12 месяцев) при различных температурах. Константы скорости образования кислотных видов наряду с соответствующей стандартной ошибкой (SE) определяли при различных температурах хранения методом множественной линейной регрессии, описанным выше. Результаты обобщены в таблице 26.

Как и ожидалось, результаты, представленные в таблице 26, свидетельствуют о том, что скорость образования кислотных и щелочных видов возрастала с увеличением температуры хранения. При хранении при 2-8°C в течение вплоть до 12 месяцев ни для одной из изученных композиций не было выявлено никаких изменений в образовании кислотных видов. Однако при увеличении температуры хранения на 10°C (с 25°C до 35°C) скорость образования кислотных видов возрастала в среднем в 3,1-3,4 раза.

Результаты, представленные в таблице 26, демонстрируют, что стабильность молекулы мономера Fc (CSL730) при более низкой концентрации белка (120 мг/мл) оказалась немного более высокой при температуре хранения 25°C, чем стабильность той же самой композиции при более высокой концентрации белка (160 мг/мл).

Результаты, представленные в таблице 26, демонстрируют также, что стабильность молекулы мультимера Fc (CSL730) в отношении образования кислотных видов при фиксированном молярном соотношении, составляющем примерно 1:420, в присутствии сахарозы, трегалозы или пролина при 25°C оказалась сопоставимой. Результаты, полученные при 35°C являются менее убедительными из-за наличия меньшего количества образцов для анализа при указанной температуре.

Таблица 26: Обобщение данных, полученных с помощью CEX, о % кислотных видов в сравнении с начальным (T0) % кислотных видов, изменениях % кислотных видов при 2-8°C через 3 месяца и константах скорости образования кислотных видов k (± SE) после хранения в течение 3 месяцев при 25°C и 40°C

Код композиции	T0 (кислотные виды)	Δ при 2-8°C через T=12 месяцев	$k_{25°C}$	$K_{35°C}$
F1	56,9	0,1	1,37 ± 0,03	4,72 ± 0,46
F2	56,8	0,0	1,33 ± 0,04	(5,63 ± 0,31)*
F3	56,9	0,1	1,40 ± 0,03	4,57 ± 0,51
F4	56,8	0,0	1,32 ± 0,05	(8,65 ± 0,78)*
F5	56,9	0,4	1,54 ± 0,04	4,80 ± 0,58
F6	56,9	0,0	1,44 ± 0,04	4,68 ± 0,55

* оценка скорости не является репрезентативной. Недостаточно пригодных образцов для анализа в моменты времени >2-3 месяцев

Для 6 композиций не было выявлено существенных различий в % щелочных видов в различные моменты времени и при различных температурах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция мультимера Fc, содержащая

а) мультимер Fc в концентрации от 60 мг/мл до 180 мг/мл,

б) значение pH от 4,8 до 6,0 и

в) стабилизатор в концентрации от 200мМ до 450мМ.

2. Композиция мультимера по п. 1, содержащая мультимер Fc в концентрации от 70 мг/мл до 110 мг/мл.

3. Композиция мультимера по п. 1, содержащая мультимер Fc в концентрации от 110 мг/мл до 180 мг/мл, в частности, 120 мг/мл или 160 мг/мл.

4. Композиция мультимера по одному из п.п. 1-3, где композиция содержит буфер.

5. Композиция мультимера по п. 4, в которой значение pH составляет от 5,0 до 5,5.

6. Композиция мультимера по п. 4 или п. 5, в которой буфер представляет собой ацетатный буфер, гистидиновый буфер или цитратный буфер.

7. Композиция мультимера по одному из п.п. 1-6, в которой стабилизатор представляет собой полиол, в частности, дисахарид, предпочтительно сахарозу или трегалозу, или сорбит.

8. Композиция мультимера по одному из предыдущих пунктов, в которой молярное соотношение мультимера Fc и стабилизатора составляет от 1:300 до 1:650, в частности, от 1:400 до 1:425.

9. Композиция мультимера по одному из п.п. 1-8, дополнительно содержащая антиоксидант, в частности, метионин.

10. Композиция мультимера по одному из п.п. 1-9, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество, в частности, полисорбат 80.

11. Композиция мультимера, содержащая композицию мультимера Fc по одному из п.п. 1-10 в лиофилизированной форме.

12. Композиция мультимера по одному из предыдущих пунктов, в которой мультимер Fc состоит из 3-10 Fc-участков.

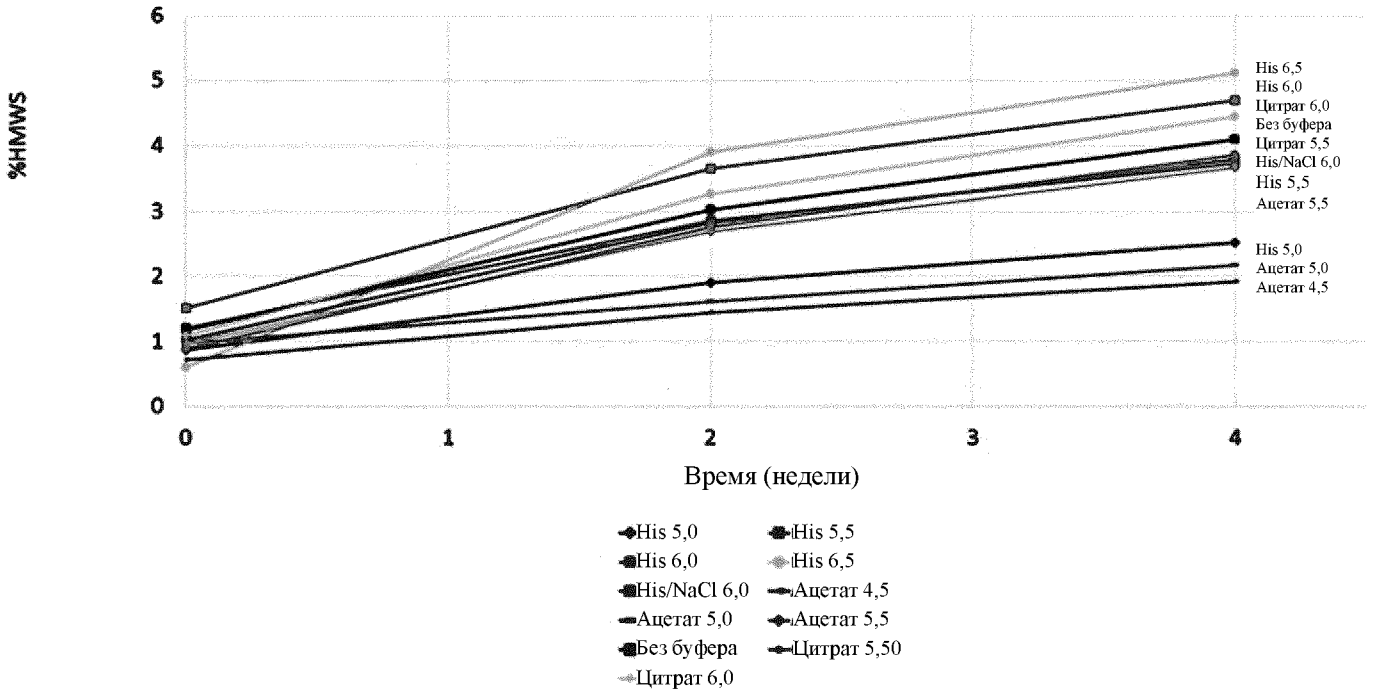
13. Композиция мультимера по п. 12, в которой мультимер Fc состоит из 3 Fc-участков.

14. Композиция мультимера по п. 13, в которой каждый Fc-участок содержит 2 полипептида Fc, каждый из которых содержит шарнирную область, константный CH2-домен и константный CH3-домен.

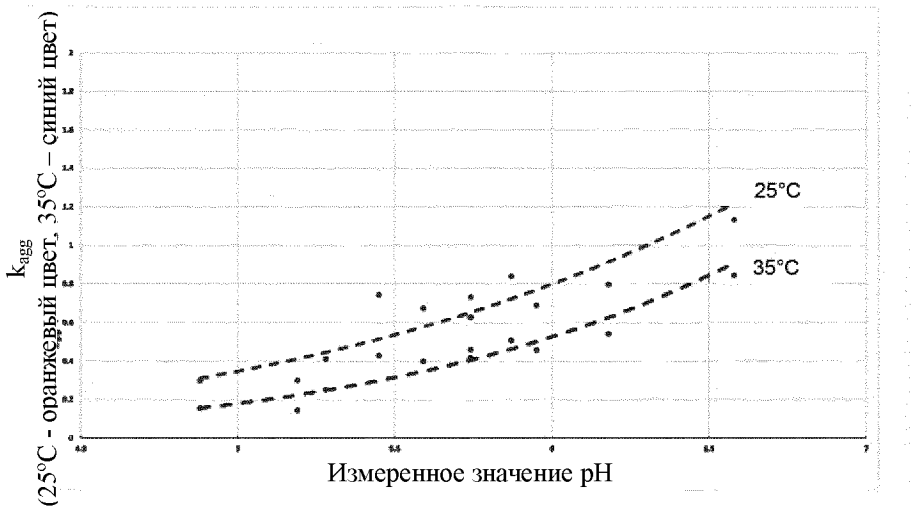
15. Композиция мультимера по п. 14, в которой мультимер Fc содержит два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 и два полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

16. Композиция мультимера по одному из п.п. 1-15, предназначенная для применения при лечении аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания.

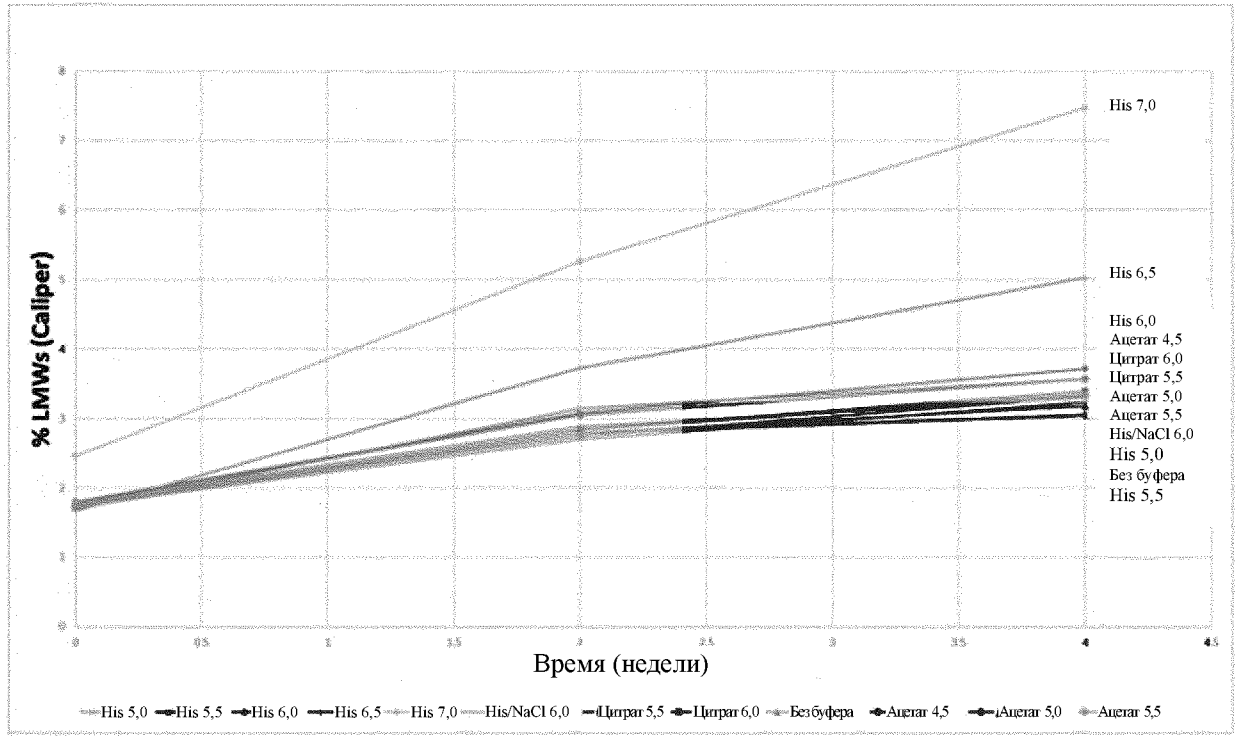
Фиг. 1


%HMWS
6
5
4
3
2
1
0
0
1
2
3
4
Время (недели)
His 6,5
His 6,0
Цитрат 6,0
Без буфера
Цитрат 5,5
His/NaCl 6,0
His 5,5
Ацетат 5,5
His 5,0
Ацетат 5,0
Ацетат 4,5
His 5,0
His 5,5
His 6,0
His 6,5
His/NaCl 6,0
Ацетат 4,5
Ацетат 5,0
Ацетат 5,5
Без буфера
Цитрат 5,50
Цитрат 6,0

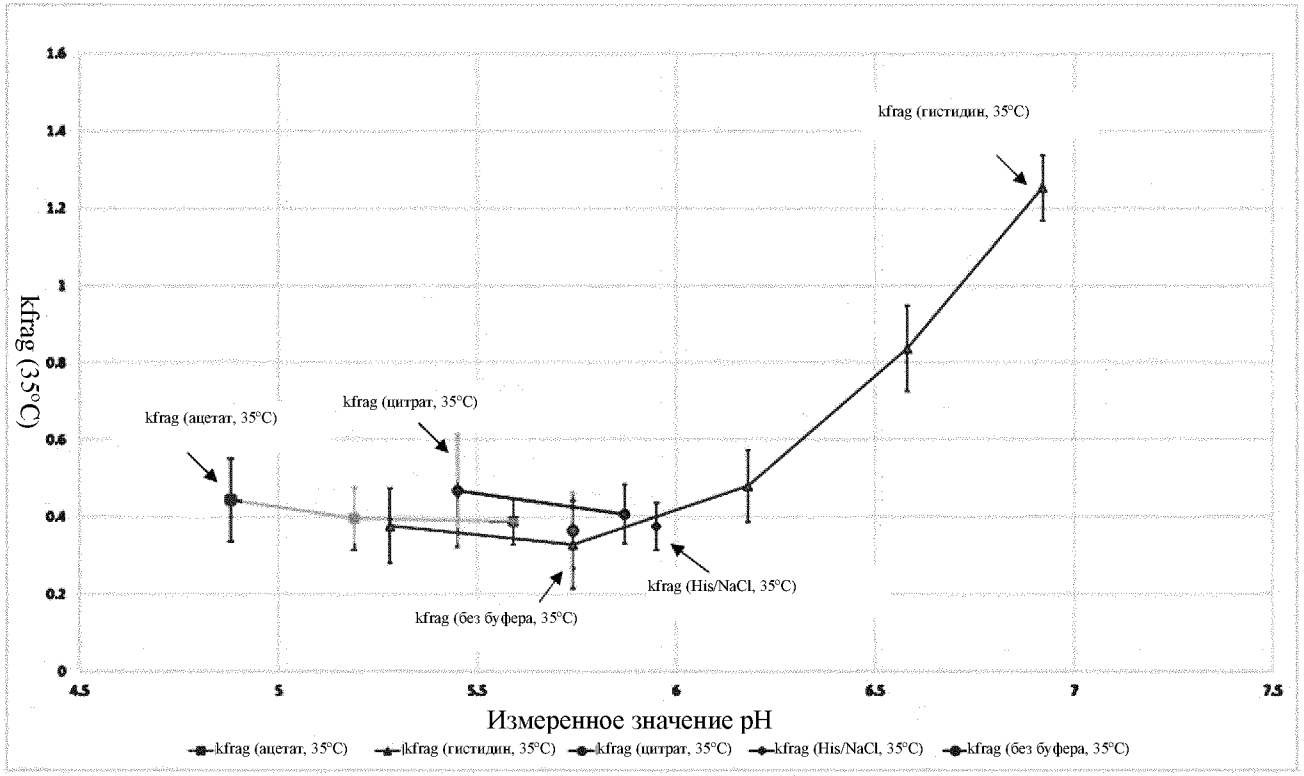
Фиг. 2


k_{agg} (25°C - оранжевый цвет, 35°C – синий цвет)
25°C
35°C
Измеренное значение pH

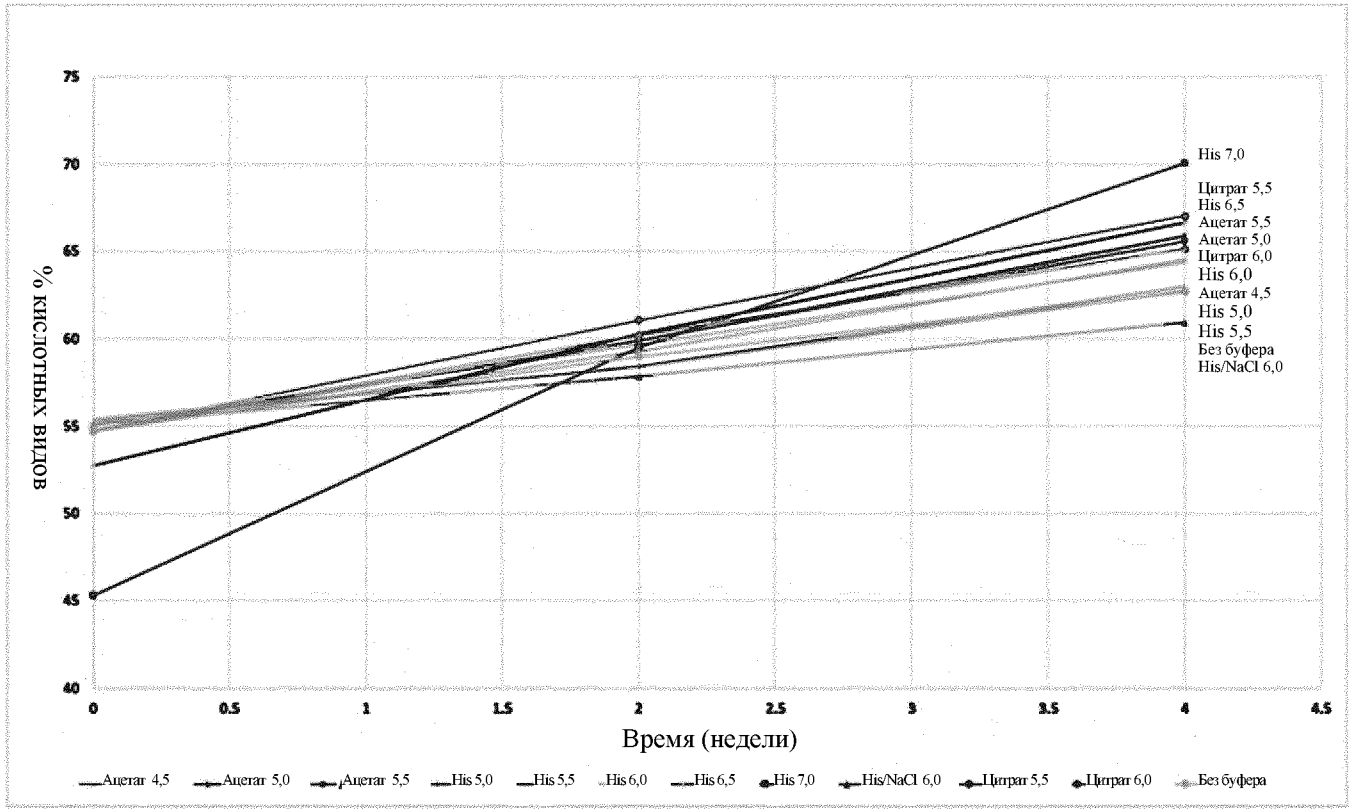
Фиг. 3


% LMWs (Caliper)
Время (недели)
His 7,0
His 6,5
His 6,0
Ацетат 4,5
Цитрат 6,0
Цитрат 5,5
Ацетат 5,0
Ацетат 5,5
His/NaCl 6,0
His 5,0
Без буфера
His 5,5
His 5,0 His 5,5 His 6,0 His 6,5 His 7,0 His/NaCl 6,0 Цитрат 5,5 Цитрат 6,0 Без буфера Ацетат 4,5 Ацетат 5,0 Ацетат 5,5

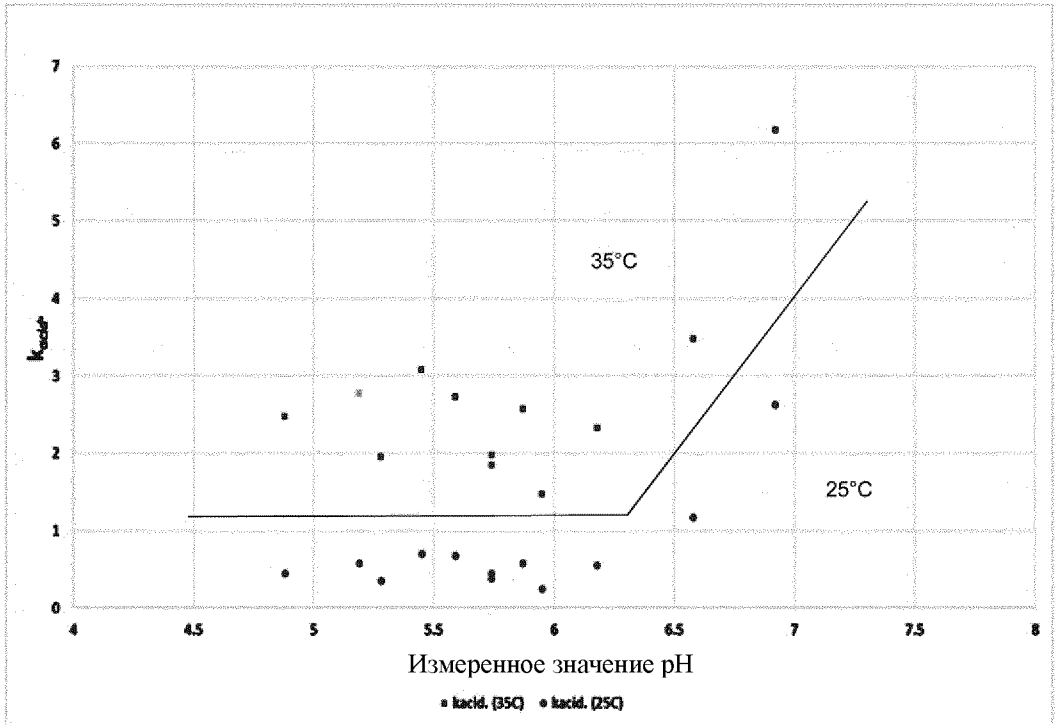
Фиг. 4


kfrag (гистидин, 35°C)
kfrag (ацетат, 35°C)
kfrag (цитрат, 35°C)
kfrag (His/NaCl, 35°C)
kfrag (без буфера, 35°C)
kfrag (35°C)
Измеренное значение pH
kfrag (ацетат, 35°C)
kfrag (гистидин, 35°C)
kfrag (цитрат, 35°C)
kfrag (His/NaCl, 35°C)
kfrag (без буфера, 35°C)

Фиг. 5

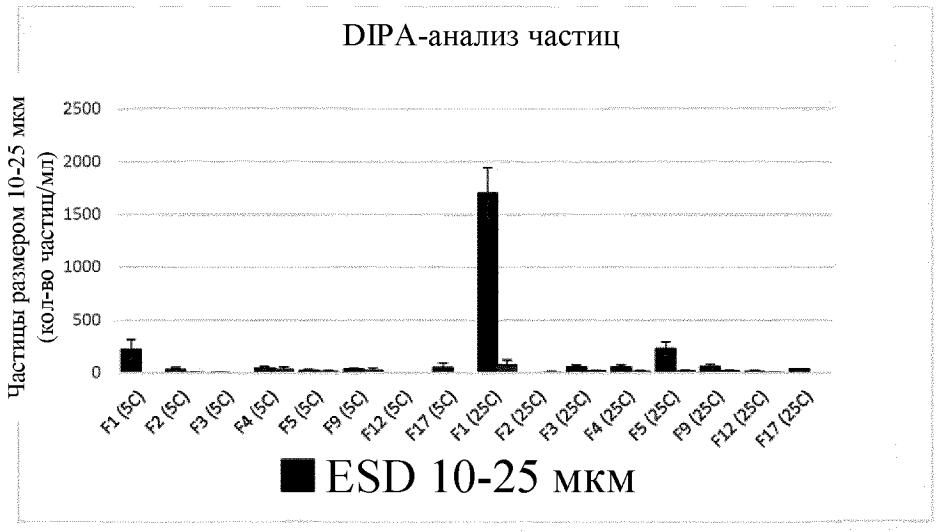

% кислотных видов
75
70
65
60
55
50
45
40
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
Время (недели)
His 7,0
Цитрат 5,5
His 6,5
Ацетат 5,5
Ацетат 5,0
Цитрат 6,0
His 6,0
Ацетат 4,5
His 5,0
His 5,5
Без буфера
His/NaCl 6,0
Ацетат 4,5
Ацетат 5,0
Ацетат 5,5
His 5,0
His 5,5
His 6,0
His 6,5
His 7,0
His/NaCl 6,0
Цитрат 5,5
Цитрат 6,0
Без буфера

Фиг. 6

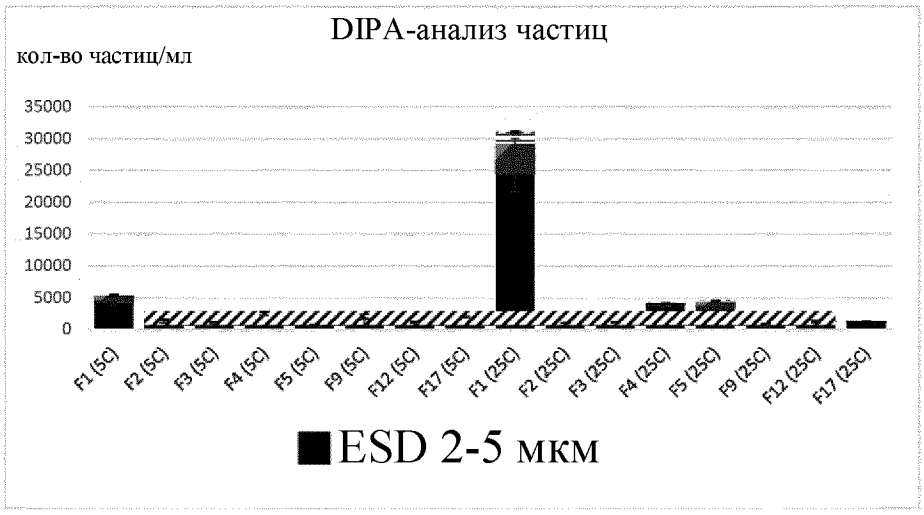

7
6
5
4
3
2
1
0
4
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
35°C
25°C
Измеренное значение pH
kacid. (35C)
kacid. (25C)

Фиг. 7

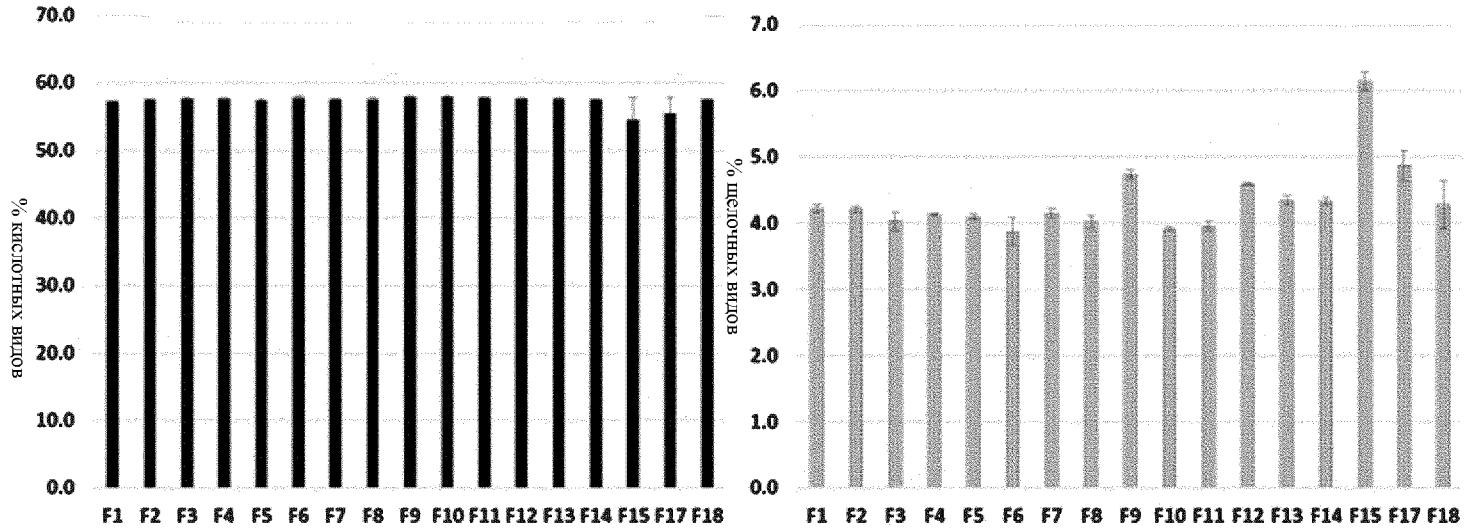
А

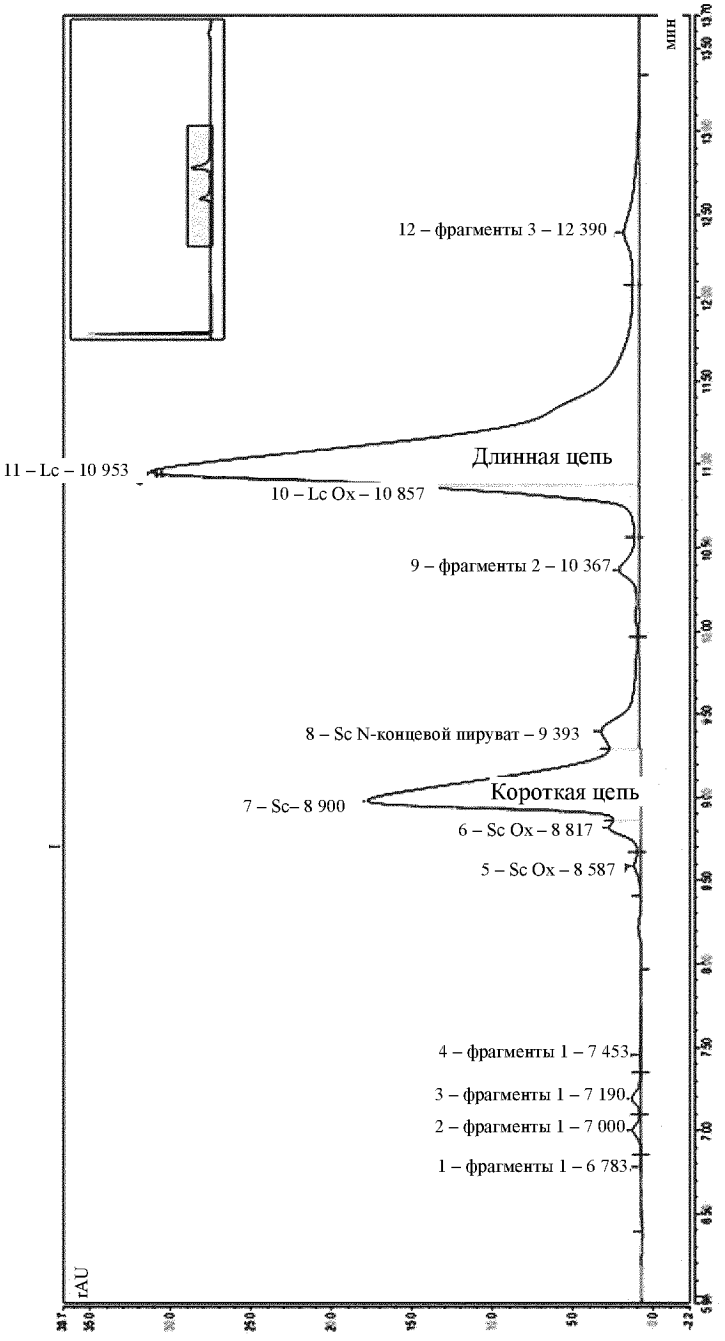

DIPA-анализ частиц
Частицы размером 10-25 мкм (кол-во частиц/мл)
2500
2000
1500
1000
500
0
F1 (5C)
F2 (5C)
F3 (5C)
F4 (5C)
F5 (5C)
F9 (5C)
F12 (5C)
F17 (5C)
F1 (25C)
F2 (25C)
F3 (25C)
F4 (25C)
F5 (25C)
F9 (25C)
F12 (25C)
F17 (25C)
ESD 10-25 мкм

Б


DIPA-анализ частиц
кол-во частиц/мл
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
F1 (5C)
F2 (5C)
F3 (5C)
F4 (5C)
F5 (5C)
F9 (5C)
F12 (5C)
F17 (5C)
F1 (25C)
F2 (25C)
F3 (25C)
F4 (25C)
F5 (25C)
F9 (25C)
F12 (25C)
F17 (25C)
ESD 2-5 мкм

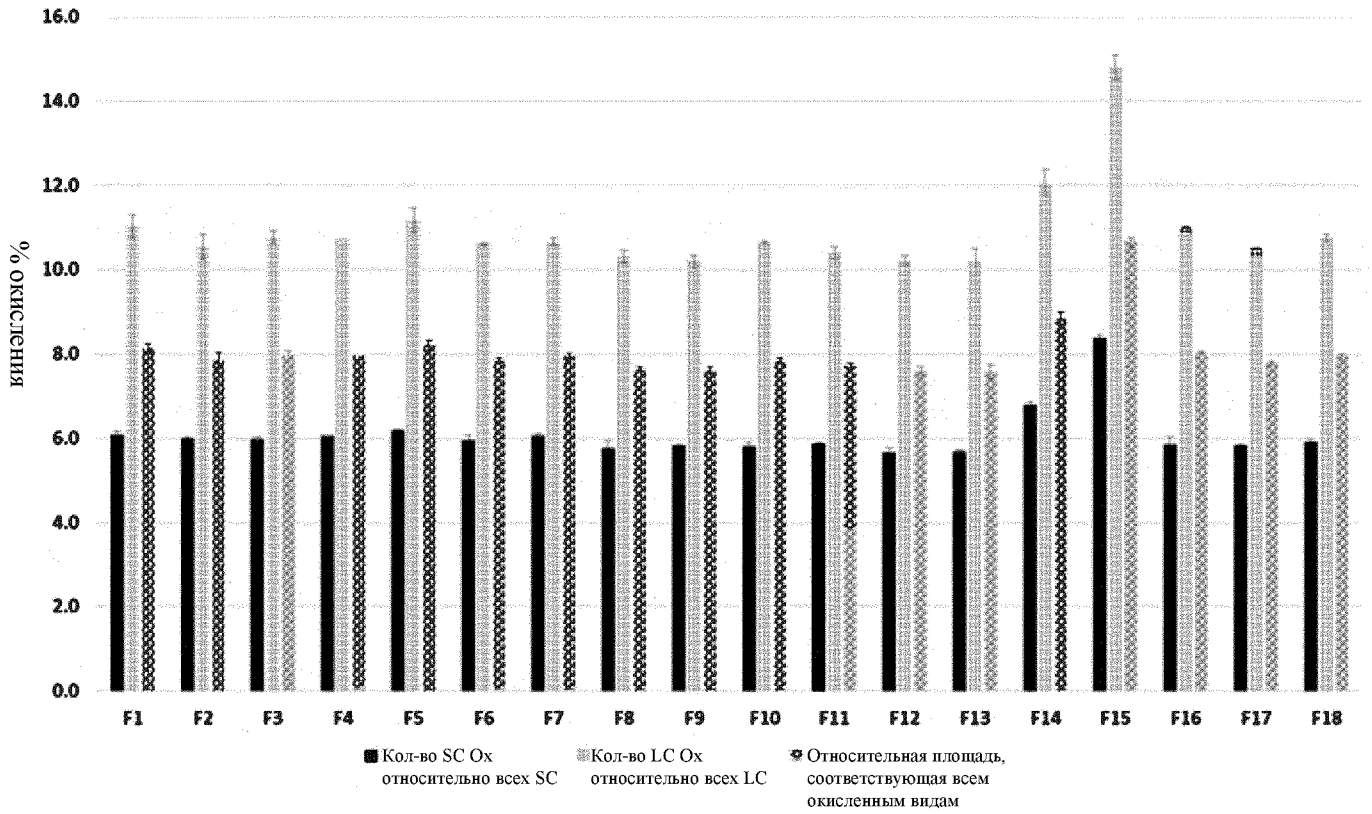
Фиг. 8


% кислотных видов
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F17 F18
% щелочных видов
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F17 F18

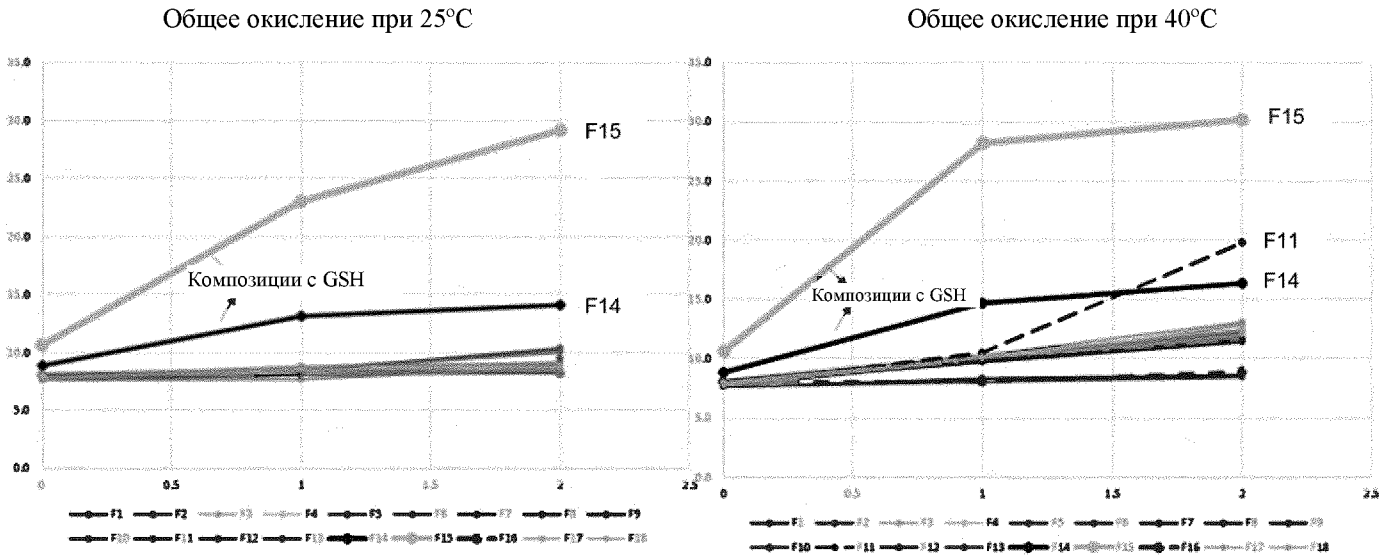
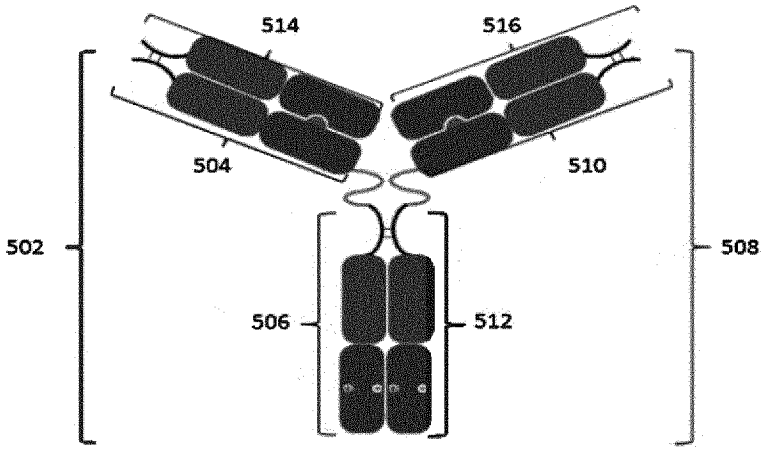

мин
mAU
12 – фрагменты 3 – 12 390
Длинная цепь
11 – Lc – 10 953
10 – Lc Ox – 10 857
9 – фрагменты 2 – 10 367
8 – Sc N-концевой пируват – 9 393
Короткая цепь
7 – Sc– 8 900
6 – Sc Ox – 8 817
5 – Sc Ox – 8 587
4 – фрагменты 1 – 7 453
3 – фрагменты 1 – 7 190
2 – фрагменты 1 – 7 000
1 – фрагменты 1 – 6 783

Фиг. 9

Фиг. 10


16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
% окисления
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
F11
F12
F13
F14
F15
F16
F17
F18
Кол-во SC Ox относительно всех SC
Кол-во LC Ox относительно всех LC
Относительная площадь, соответствующая всем окисленным видам

Фиг. 11


Общее окисление при 25°C
Композиции с GSH
F15
F14
Общее окисление при 40°C
Композиции с GSH
F15
F11
F14

Фиг. 12