

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042435

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.14

(21) Номер заявки
201790989

(22) Дата подачи заявки
2015.11.06

(51) Int. Cl. A61K 9/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) СТАБИЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ РАСТВОРА БЕЛКА, СОДЕРЖАЩЕГО АНТИ-VEGF
АНТИТЕЛО В ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ

(31) 62/076,770; 62/088,061

(32) 2014.11.07; 2014.12.05

(33) US

(43) 2017.09.29

(86) PCT/US2015/059571

(87) WO 2016/073915 2016.05.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(56) WO-A2-2009155724
US-A1-2006088523
US-A1-2013004484

(72) Изобретатель:
Чжан Хойсян, Боринг Чарльз,
Кулшрештха Алок, Цзэн Юйхун, Вань
Ли, Алани Ламан (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к водной фармацевтической композиции для лечения глазной болезни, опосредуемой VEGF, включающей анти-VEGF антитело, содержащей последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, сахарозу или трегалозу, лимонную кислоту, дигидрат тринатрийцитрата и полисорбат 80 в определенных соотношениях, шприцу, содержащему указанную композицию, способу доставки и способу лечения с использованием указанной композиции.

042435

B1

042435

B1

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США рег. No. 62/088061, поданной 5 декабря 2014, и предварительной заявки на патент США рег. No. 62/076770, поданной 7 ноября 2014, содержание которых во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к водным фармацевтическим препаратам анти-VEGF антител, к способу их получения и к их применению.

Предшествующий уровень техники

Васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF) представляет собой известный регулятор ангиогенеза и неоваскуляризации, который, как было обнаружено, является ключевым медиатором неоваскуляризации, ассоциированной с развитием опухолей и внутриглазных расстройств (Ferrara et al. *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997)). мРНК VEGF сверхэкспрессируется во многих человеческих опухолях, и концентрация VEGF в глазных жидкостях в высокой степени коррелирует с присутствием активно пролиферирующих кровеносных сосудов у пациентов с диабетической ретинопатией и с ретинопатией других типов, ассоциированных с ишемией (Berkman et al., *J Clin Invest* 91:153-159 (1993); Brown et al. *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown et al. *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern et al. *Brit. J. Cancer.* 73:931-934 (1996); и Dvorak et al. *Am J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995); Aiello et al. *N. Engl. J. Med.* 331:1480-1487 (1994)). Кроме того, недавно проведенные исследования выявили присутствие локализованного VEGF в хориоидальных неоваскулярных мембранах у пациентов, страдающих ВДЖП (Lopez et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-868 (1996)). Нейтрализующие анти-VEGF антитела могут быть использованы для подавления роста различных человеческих опухолевых клеточных линий у "голых" мышей, а также для ингибирования внутриглазного ангиогенеза у моделей с ишемическими заболеваниями сетчатки (Kim et al. *Nature* 362:841-844 (1993); Warren et al. *J. Clin. Invest* 95:1789-1797 (1995); Borgstrom et al. *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); and Melnyk et al. *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) (Adamis et al. *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996)).

Некоторые антитела, включая анти-VEGF антитела, были разрешены для терапевтического лечения человека и других млекопитающих. Концентрация терапевтических антител в жидких фармацевтических препаратах широко варьируется в зависимости, например, от способа введения. Если желательно использовать небольшие объемы фармацевтического препарата, то часто необходимо, чтобы такой препарат содержал антитело в высокой концентрации. Так, например, препараты с высокой концентрацией антитела могут оказаться желательными для инъекции в стекловидное тело или подкожной инъекции.

Однако, препараты с высокой концентрацией антитела могут иметь небольшой срок хранения и терять свою биологическую активность из-за химической и физической нестабильности в процессе хранения. Известно, что основными причинами разложения антител являются агрегация, дезамидирование и окисление. В частности, агрегация может вызывать повышенный иммунный ответ у пациентов, что связано с риском ухудшения их состояния здоровья. Таким образом, такая агрегация должна быть минимизирована или полностью предотвращена.

Образование частиц в биотерапевтических препаратах также значительно ухудшает качество таких препаратов, поскольку частицы, имеющие размеры в десятки микрон или субмиллиметровые и миллиметровые размеры, обычно видны человеческим невооруженным глазом (см. Das, 2012, *AAPS Pharm-SciTech*, 13:732-746). Частицы, содержащиеся в терапевтических офтальмических препаратах, могут вызывать повреждение глаза. Поэтому существуют разработанные Регуляторными органами стандарты, гарантирующие присутствие визуально недетектируемых частиц в офтальмических препаратах с определенными ограничениями. Так, например, в соответствии с Соглашением Фармакопеи США (USP) имеется ряд требований, ограничивающих размеры частиц в офтальмических растворах, и согласно этим требованиям, максимальное число частиц диаметром ≥ 10 мкм должно составлять 50 частиц на мл; максимальное число частиц диаметром ≥ 25 мкм должно составлять 5 частиц на мл; и максимальное число частиц диаметром ≥ 50 мкм должно составлять 2 частицы на мл, как было определено путем подсчета частиц под микроскопом (см. главу "Общая фармакопея USP" <789>).

Методы продуцирования препаратов с высокой концентрацией антител известны специалистам. Однако пока не существует универсального метода предотвращения непредсказуемого влияния аминокислотной последовательности антитела на тенденцию образования агрегатов или их разложения в присутствии различных фармацевтических наполнителей, буферов и т.п. Кроме того, получение офтальмического препарата с высокой концентрацией белка (такого как антитело), содержащего визуально недетектируемые частицы на допустимом уровне, является проблематичным и имеет непредсказуемые последствия.

Целью настоящего изобретения является получение других более усовершенствованных препаратов, которые имели бы высокую концентрацию анти-VEGF антител, но при этом низкие уровни агрегации антител с визуально недетектируемыми частицами, и которые могли бы быть использованы для введения человеку, а в частности, в человеческий глаз.

Описание сущности изобретения

В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к водной фармацевтической композиции, содержащей высокую концентрацию анти-VEGF антитела и подходящей для офтальмической инъекции.

В некоторых аспектах изобретения, водные фармацевтические композиции согласно изобретению имеют низкие или почти недетектируемые уровни агрегации или разложения антител и обладают очень незначительной биологической активностью или вообще не обладают биологической активностью в процессе промышленного изготовления, приготовления препаратов, транспортировки и длительных периодов хранения данных композиций, где концентрация анти-VEGF антитела в такой композиции составляет по меньшей мере приблизительно 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 мг/мл.

Настоящее изобретение относится к водным фармацевтическим композициям, содержащим анти-VEGF антитело, стабилизатор, буфер и поверхностно-активное вещество. В некоторых аспектах изобретения, водная фармацевтическая композиция содержит: (i) по меньшей мере 50 мг/мл анти-VEGF антитела, (ii) сахарозу или трегалозу в качестве стабилизатора, (iii) цитратный или гистидиновый буфер и (iv) полисорбат 80 в качестве поверхностно-активного вещества.

В некоторых аспектах изобретения, водная фармацевтическая композиция содержит приблизительно 4,5-11% (мас./об.) сахарозы или 5-10% (мас./об.) трегалозы, 0,006-0,012% (мас./об.) лимонной кислоты, 0,2-0,6% (мас./об.) дигидрата тринатрийцитрата, и приблизительно 0,01-0,1% (мас./об.) полисорбата 80, где pH указанного препарата составляет 6,3-7,3.

Конкретные предпочтительные варианты осуществления изобретения будут более очевидны из нижеследующего подробного описания некоторых предпочтительных вариантов и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен график результатов анализа на мутность для препарата 1008, полученного при различных pH. По оси X отложено время инкубирования при 55°C; а по оси Y отложена оптическая плотность, мониторинг которой проводили на 350 нм.

На фиг. 2A и на 2B представлены результаты анализа на мутность, проводимого путем мониторинга изменений OD₃₆₀ для различных препаратов антитела 1008, инкубированных при 55°C в течение 180 минут (фиг. 2A). Кривые OD₃₆₀, полученные в течение 60 минут, были расширены и показаны на фиг. 2B. Номера образцов на фиг. 2A и 2B соответствуют номеру препарату в табл. 13.

На фиг. 3 представлены результаты анализа на мутность, где для простоты, данные брали в течение периода времени от 0 до 90 минут. Время всего эксперимента составляло 180 минут. Мониторинг изменений OD₃₆₀ проводили для различных препаратов антитела 1008, инкубированных при 55°C. Номера образцов на данном чертеже соответствуют номерам препаратов в табл. 15.

На фиг. 4 представлен график, на котором показаны результаты ЭХ главного пика для восьми выбранных препаратов, хранившихся в течение 6 недель при 40°C.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к водным фармацевтическим композициям, содержащим анти-VEGF антитело в высокой концентрации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению является стабильной по меньшей мере в течение 18 месяцев при 2-8°C и может быть использована для внутриглазного введения, включая инъекцию или инфузию. В конкретном варианте осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению удовлетворяет требованиям согласно USP <789> с точки зрения присутствия частиц. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, максимальное число частиц диаметром ≥ 10 мкм в водной фармацевтической композиции согласно изобретению составляет 50 частиц на мл; максимальное число частиц диаметром ≥ 25 мкм в водной фармацевтической композиции согласно изобретению составляет 5 частиц на мл; и максимальное число частиц диаметром ≥ 50 мкм в водной фармацевтической композиции согласно изобретению составляет 2 частицы на мл, где указанное число частиц было определено методом подсчета частиц в режиме светотени и/или подсчета частиц под микроскопом в соответствии с требованиями, описанными в главе <789> "Общая Фармакопея USP".

Используемый здесь термин "водная" фармацевтическая композиция означает композицию, подходящую для ее применения в фармацевтике, где водным носителем является дистиллированная вода. Композиция, подходящая для ее применения в фармацевтике, может быть стерильной, гомогенной и/или изотонической. Водные фармацевтические композиции могут быть приготовлены либо непосредственно в водной форме, например, в виде предварительно заполненного шприца, готового к применению (в виде "жидких препаратов"), либо в виде лиофилизата, который может быть разведен непосредственно перед его использованием. Используемый здесь термин "водная фармацевтическая композиция" означает жидкий препарат или разведенный лиофилизированный препарат. В некоторых вариантах осуществления изобретения, водные фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть использованы для внутриглазного введения человеку. В конкретном варианте осуществления изобретения, водные фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть использованы для введения в стекловидное тело. В другом варианте осуществления изобретения, водные фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть введены путем инфузии в стекловидное тело.

Настоящее изобретение относится к новым фармацевтическим препаратам, а в частности, к новым фармацевтическим препаратам, в которых активный ингредиент содержит антитела против человеческого VEGF. В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к водной фармацевтической

композиции, содержащей анти-VEGF антитела в высокой концентрации. Предпочтительные анти-VEGF антитела, содержащиеся в препаратах согласно изобретению, описаны в заявке WO 2009/155724, содержание которой во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Используемый здесь термин "антитело" включает целое антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающую часть", "антигенсвязывающий полипептид" или "иммунногенный связывающий фактор") или одну его цепь. "Антитело" включает гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, связанных дисульфидными связями, или его антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (также сокращенно обозначаемой здесь V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (также сокращенно обозначаемой здесь V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области V_H и V_L могут быть также подразделены на гипервариабельные области, называемые комплементарность-определяющими областями (CDR), которые чередуются с областями, являющимися более консервативными и называемыми каркасными областями (FR). Каждая из V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Используемый здесь термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела") означает один или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, VEGF). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть реализована благодаря фрагментам полноразмерного антитела. Примерами связывающихся фрагментов, входящих в объем термина "антигенсвязывающая часть" антитела, являются: (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одной ветви антитела; (v) один домен или dAb-фрагмент (Ward et al. (1989), Nature 341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) изолированная гипервариабельная область (CDR) или (vii) комбинация двух или более изолированных CDR, которые могут быть связаны, но необязательно, синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, однако они могут быть присоединены друг к другу рекомбинантными методами посредством синтетического линкера, который позволяет создать одну белковую цепь, где области V_L и V_H спариваются, образуя одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv); см. например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также входят в объем термина "антигенсвязывающая часть" антитела. Эти фрагменты антител получают стандартными методами, известными специалистам и скринируют на возможность их использования в качестве интактных антител. Антигенсвязывающие части могут быть получены методами рекомбинантных ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов. Антителами могут быть антитела различных изотипов, например, антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

VH: SEQ ID NO: 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSITDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDPY

YATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTITVTVSS

VL: SEQ ID NO: 2

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP

SRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDFFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, анти-VEGF антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) антитела, содержащий последовательность

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP

SRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDFFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGSGGGSGG

GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSITDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDD

DPYYATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 3)

Анти-VEGF антитело, присутствующее в водной фармацевтической композиции согласно изобре-

тению, может быть получено, например, как описано в заявке WO 2009/155724. scFv может быть получен с использованием экспрессионного вектора, описанного в этой заявке. Метионин старт-кодона в экспрессионном векторе присутствует в конечном белке в тех случаях, когда он не был подвергнут посттрансляционному расщеплению (см. SEQ ID NO: 4 в примерах).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти-VEGF антитело в водной фармацевтической композиции согласно изобретению содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

SEQ ID NO: 5	GFSLTDYYMT
SEQ ID NO: 6	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 7	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 8	QASEIIHSWLA
SEQ ID NO: 9	LASTLAS
SEQ ID NO: 10	QNVYLASTNGAN

В одном из вариантов осуществления изобретения, концентрация анти-VEGF антитела в водной фармацевтической композиции согласно изобретению составляет по меньшей мере 50 мг/мл. Предпочтительно, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизительно 170 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 210 мг/мл, приблизительно 220 мг/мл, приблизительно 230 мг/мл, приблизительно 240 мг/мл, приблизительно 250 мг/мл или приблизительно 300 мг/мл анти-VEGF антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит от 60 мг/мл до 120 мг/мл анти-VEGF антитела, например антитела, включающего SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит 60 мг/мл анти-VEGF антитела, включающего SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит 120 мг/мл анти-VEGF антитела, включающего SEQ ID NO: 3.

Водные фармацевтические композиции согласно изобретению включают, помимо анти-VEGF антитела, и другие один или более компонентов, таких как: (i) стабилизатор; (ii) забуферивающий агент; (iii) поверхностно-активное вещество; и (iv) свободная аминокислота. Включение каждого из таких дополнительных компонентов может сообщать композициям низкую степень агрегации анти-VEGF антитела. Предпочтительно, водные фармацевтические композиции согласно изобретению, помимо анти-VEGF антитела, включают: (i) стабилизатор; (ii) забуферивающий агент; и (iii) поверхностно-активное вещество.

Подходящий стабилизатор, используемый в настоящем изобретении, может действовать, например, как агент, повышающий вязкость; агент, придающий объем; солюбилизующий агент и/или т.п. Стабилизатор может быть ионным или неионным (например, сахара). Сахарами, которые могут быть включены в композицию, являются, но не ограничиваются ими, моносахариды, например, фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, например, лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, например, раффиноза, мелезитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, смесь ксилита и сорбита (глюцит) и т.п. Так, например, подходящими сахарами могут быть сахароза, трегалоза, раффиноза, мальтоза, сорбит или маннит. В качестве сахара могут быть использованы спирт ряда Сахаров или аминоксахар. Предпочтительно являются сахароза и трегалоза. Наиболее предпочтительной является сахароза. В качестве ионного стабилизатора могут служить соли, такие как NaCl или аминокислотные компоненты, такие как аргинин-HCl.

Подходящими забуферивающими агентами, используемыми в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; Трис, гидрохлорид тометамин или фосфатный буфер. Кроме того, аминокислотные компоненты могут быть также использованы в качестве забуферивающего агента. Особенно подходящими являются цитратный или гистидиновый буфер, включая 10-20 mM гистидинового буфера, например, 0,13-0,26% (мас./об.) гистидина и 0,03-0,07% (мас./об.) моногидрата гидрохлорида гистидина, или 10-20 mM цитратного буфера, например, 0,006-0,012% (мас./об.) лимонной кислоты и 0,2-0,6% (мас./об.) дигидрата тринатрийцитрата. Лимонная кислота, используемая для приготовления препарата согласно изобретению, может быть получена в любой гидратированной форме, например, в безводной форме или в форме моногидрата.

Водные фармацевтические композиции включают указанный забуферивающий агент или pH-

корректирующий агент для улучшения регуляции pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению имеет pH от 5,0 до 8,0, от 5,0 до 7,0, от 6,0 до 8,0, или от 6,0 до 7,0. В одном из вариантов осуществления изобретения, pH водной фармацевтической композиции согласно изобретению составляет приблизительно от 6,3 до 7,3. В конкретном варианте осуществления изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению имеет pH приблизительно 6,8.

Используемый здесь термин "поверхностно-активное вещество" означает органические вещества, имеющие амфипатические структуры, т.е. эти вещества состоят из групп, имеющих тенденцию к изменению степени растворимости, а обычно, такими группами являются углеводородная цепь, растворимая в масле, и ионная группа, растворимая в воде. Поверхностно-активные вещества могут быть классифицированы в зависимости от заряда поверхностно-активной молекулы на анионные, катионные и диспергирующие агенты, используемые для получения различных фармацевтических композиций и препаратов биологических материалов.

Подходящими поверхностно-активными веществами, используемыми в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, неионные поверхностно-активные вещества, ионные поверхностно-активные вещества и цвиттерионные поверхностно-активные вещества. Типичными поверхностно-активными веществами, используемыми в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, сложные эфиры сорбитана и жирной кислоты (например, сорбитанмонокаприлат, сорбитанмонолаурат, сорбитанмонопальмитат); сорбитантриолеат; сложные эфиры глицерина и жирной кислоты (например, монокаприлат глицерина, мономиристат глицерина, моностеарат глицерина); сложные эфиры полиглицерина и жирной кислоты (например, декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат, декаглицерилмоноолеат); сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты (например, монолаурат полиоксиэтиленсорбитана, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана, моностеарат полиоксиэтиленсорбитана, монопальмитат полиоксиэтиленсорбитана, триолеат полиоксиэтиленсорбитана, тристеарат полиоксиэтиленсорбитана); сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и жирной кислоты (например, тетрастеарат полиоксиэтиленсорбита, тетраолеат полиоксиэтиленсорбита); сложные эфиры полиоксиэтиленглицерина и жирной кислоты (например, полиоксиэтиленглицерилмоностеарат); сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирной кислоты (например, дистеарат полиэтиленгликоля); алкиловые эфиры полиоксиэтилена (например, лауриловый эфир полиоксиэтилена); алкиловые эфиры полиоксиэтилена и полиоксипропилена (например, гликолевый эфир полиоксиэтилена и полиоксипропилена, пропиловый эфир полиоксиэтилена и полиоксипропилена, цетиловый эфир полиоксиэтилена и полиоксипропилена); алкилфениловые эфиры полиоксиэтилена (например, нонилфениловый эфир полиоксиэтилена); полиоксиэтилированные гидрогенизированные касторовые масла (например, полиоксиэтилированное касторовое масло, полиоксиэтилированное гидрогенизированное касторовое масло); полиоксиэтилированные производные пчелиного воска (например, пчелиный воск на основе полиоксиэтиленсорбита); полиоксиэтилированные производные ланолина (например, полиоксиэтилированный ланолин); и амиды полиоксиэтилена и жирной кислоты (например, амид полиоксиэтилена и стеариновой кислоты); C₁₀-C₁₈-алкилсульфаты (например, цетилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия, олеилсульфат натрия); сульфат полиоксиэтилена и C₁₀-C₁₈-алкилового эфира, в котором среднее молярное число присоединенных этиленоксидных звеньев составляет 2-4 (например, полиоксиэтилированный лаурилсульфат натрия) и соли сложного эфира C₁-C₁₈-алкилсульфосукцината (например, лауриловый сложный эфир сульфосукцината натрия), и природные поверхностно-активные вещества, такие как лецитин, глицерофосфолипид, сфингофосфолипиды (например, сфингомиелин); и сложные эфиры сахарозы и C₁₂-C₁₈-жирных кислот. Композиция может включать один или более таких поверхностно-активных веществ. Предпочтительными поверхностно-активными веществами являются сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты, например, полисорбат 20, 40, 60 или 80. Особенно предпочтительным является полисорбат 80.

Подходящими свободными аминокислотами, используемыми в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, аргинин, лизин, гистидин, орнитин, изолейцин, лейцин, аланин, глицин, глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота. Предпочтительно, чтобы в композицию была включена основная аминокислота, т.е. аргинин, лизин и/или гистидин. Если композиция включает гистидин, то он может действовать как забуферивающий агент и свободная аминокислота, а если используется гистидиновый буфер, то он обычно включают свободную аминокислоту, не являющуюся гистидином, например, гистидиновый буфер и лизин. Аминокислота может присутствовать в D- и/или L-форме, но обычно она присутствует в L-форме. Аминокислота может присутствовать в виде любой подходящей соли, например, в виде гидрохлоридной соли, такой как аргинин-HCl. В одном из предпочтительных вариантов изобретения, водная фармацевтическая композиция согласно изобретению не содержит каких-либо свободных аминокислот.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в водной фармацевтической композиции согласно изобретению, например, после разведения лиофилизата в воде, сахар присутствует в концентрации 3-11% (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сахаром является сахароза в концентрации приблизительно от 4,5 до 11%, или трегалоза в концентрации приблизительно от 5 до 10%. Предпочтительно, концентрация сахарозы составляет 6,75% (мас./об.).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в водной фармацевтической композиции согласно изобретению, например, после разведения лиофилизата в воде, забуферивающий агент присутствует в концентрации от 1 до 60 мМ, например, 10-40 мМ, 15-30 мМ, 15-25 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, забуферивающим агентом является цитрат или гистидин. Предпочтительно, концентрация цитратного буфера составляет 15 мМ.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в водной фармацевтической композиции согласно изобретению, например, после разведения лиофилизата в воде, поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации до 0,2% (по объему), например, в концентрации 0,01-0,1%, 0,03-0,08%, 0,04-0,08%. Предпочтительно, концентрация полисорбата 80 составляет 0,05%.

Другими рассматриваемыми наполнителями, которые могут быть использованы в водной фармацевтической композиции согласно изобретению, является, например, антимикробные агенты, антиоксиданты, антистатики, липиды, такие как фосфолипиды или жирные кислоты, стероиды, такие как холестерин, белковые наполнители, такие как сывороточный альбумин (альбумин человеческой сыворотки), рекомбинантный человеческий альбумин, желатин, казеин, солеобразующие противоионы, такие как натрий и т.п. Эти и другие известные фармацевтические наполнители и/или добавки, подходящие для использования в препаратах согласно изобретению, известны специалистам и перечислены, например, в руководствах "The Handbook of Pharmaceutical Excipients", 4th edition, Rowe et al., Eds., American Pharmaceuticals Association (2003); и Remington: "The Science and Practice of Pharmacy", 21st edition, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005).

Предпочтительные препараты согласно изобретению представлены в табл. 40 в нижеследующих примерах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в целях приготовления водной фармацевтической композиции согласно изобретению, используемой для лечения пациента, осуществляют лиофилизацию анти-VEGF антитела.

Методы лиофилизации антител хорошо известны специалистам, см., например, John F. Carpenter and Michael J. Pikal, 1997 (Pharm. Res. 14, 969-975); Xialin (Charlie) Tang and Michael J. Pikal, 2004 (Pharm. Res. 21, 191-200).

Перед введением пациенту лиофилизата, этот лиофилизат должен быть разведен водным разбавителем. Эта стадия включает повторное растворение антитела и других компонентов, присутствующих в лиофилизате, с получением раствора, который может быть введен пациенту путем инъекции.

Объем водного материала, используемого для разведения, зависит от концентрации антитела в конечной фармацевтической композиции. Разведение разбавителем в меньшем объеме, чем до лиофилизации, позволяет получить композицию, концентрация которой превышает концентрацию композиции до лиофилизации. Коэффициент разведения (объем препарата после лиофилизации/объем препарата до лиофилизации) может составлять от 1:0,5 до 1:6. Обычно, коэффициент разведения составляет 1:3. Как упоминалось выше, лиофилизаты согласно изобретению могут быть разведены с получением аодных композиций, содержащих анти-VEGF антитело в концентрации по меньшей мере 50 мг/мл (т.е. по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 или 130 мг/мл), и в соответствии с этим может быть выбран объем разбавителя. При необходимости, препарат, перед его введением пациенту, может быть разведен в нужной дозе.

Типичными разбавителями для лиофилизированных антител являются стерильная вода или буфер, содержащие, но необязательно, консервант. Если лиофилизат включает забуферивающий агент, то разбавитель может включать дополнительный забуферивающий агент (который может быть таким же, как забуферивающий агент для лиофилизата, или отличаться от этого агента), либо он может включать другой агент, не являющийся забуферивающим агентом (например, он может включать WFI (воду для инъекций) или физиологический раствор).

Водные фармацевтические композиции согласно изобретению, содержащие анти-VEGF антитела, могут быть использованы для лечения ряда заболеваний или расстройств. Фармацевтические композиции, содержащие анти-VEGF антитела, являются особенно подходящими для лечения неоваскулярных глазных болезней у индивидуума.

"Неоваскулярные глазные болезни", которые могут быть подвергнуты лечению с использованием водной фармацевтической композиции согласно изобретению, включают состояние, заболевание или расстройство, ассоциированное с неоваскуляризацией глаз, включая, но не ограничиваясь ими, аномальный ангиогенез, хороидальную неоваскуляризацию (ХНВ), нарушение сосудистой проницаемости сетчатки, отек сетчатки, диабетическую ретинопатию (в частности, пролиферативную диабетическую ретинопатию), диабетический отек желтого пятна, неоваскулярную (экссудативную) возрастную дегенерацию желтого пятна (ВДЖП), включая ХНВ, ассоциированную с нВДЖП (неоваскулярной ВДЖП), осложнения, ассоциированные с ишемией сетчатки, закупорку центральной вены сетчатки (ЗЦВС) и неоваскуляризацию заднего сегмента сетчатки.

Водные фармацевтические композиции согласно изобретению могут включать, помимо анти-VEGF антитела, другие активные ингредиенты. Такими другими фармакологическими агентами могут быть, например, другие антитела, используемые для лечения глазных болезней.

Водные фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть введены пациенту. Используемый здесь термин "индивидуум" или "пациент" означает человека и млекопитающих, не являющихся человеком, включая, но не ограничиваясь ими, приматов, кроликов, свиней, лошадей, собак, кошек, овец и коров. Предпочтительным индивидуумом или пациентом является человек.

Введение препарата обычно осуществляют с помощью шприца. Таким образом, настоящее изобретение относится к устройству для доставки (например, к шприцу), включающему фармацевтическую композицию согласно изобретению (например, к предварительно заполненному шприцу). Пациентам вводят эффективное количество анти-VEGF антитела в виде действующего активного ингредиента (т.е. в количестве, достаточном для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта). Терапевтически эффективная доза считается достаточной, если она будет обеспечивать значительное ослабление симптомов или состояний, ассоциированных с указанным заболеванием. Терапевтически эффективная доза не обеспечивает полного излечения заболевания или полного устранения симптомов. Предпочтительно, терапевтически эффективная доза может, по меньшей мере, частично, приостановить развитие заболевания или его осложнений у пациента, уже страдающего таким заболеванием. Количество, эффективное для такого применения, зависит от тяжести расстройства, подвергаемого лечению и от общего состояния иммунной системы пациента.

Доза может быть легко определена лечащим врачом, который проводит лечение данного заболевания или состояния с применением известных методов корректировки доз. Терапевтически эффективное количество анти-VEGF антитела, используемого в водной фармацевтической композиции согласно изобретению, определяют, например, с учетом нужного объема доз и способа(ов) введения. Терапевтически эффективные композиции обычно вводят в дозе, составляющей в пределах от 0,001 мг/мл и приблизительно до 200 мг/мл. Предпочтительная доза, используемая в способе согласно изобретению, составляет приблизительно от 60 до 120 мг/мл (т.е. приблизительно 60, 70, 80, 90, 100, 110 или 120 мг/мл). В предпочтительном варианте осуществления изобретения, доза анти-VEGF антитела, используемая в способе согласно изобретению, составляет 60 или 120 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, дозу вводят непосредственно в глаза пациента. В одном из вариантов осуществления изобретения, одна доза на глаз составляет по меньшей мере приблизительно от 0,5 мг до 6 мг. Предпочтительными дозами на глаз являются дозы приблизительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 и 6,0 мг. Дозы могут быть введены в различных объемах, подходящих для офтальмического введения, таких как 50 или 100 мкл, например, включая 3 мг/50 мкл или 6 мг/50 мкл. Могут быть также использованы и меньшие объемы, включая 10 мкл или менее, например, приблизительно 10 мкл или приблизительно 8,0 мкл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, дозу 1,2 мг/10 мкл или 1 мг/8,0 мкл (например, 1 мг/8,3 мкл) вводят в глаза пациента для лечения или ослабления симптомов одного или более заболеваний и расстройств, описанных выше. Доставка может быть осуществлена, например, путем инъекции или инфузии в стекловидное тело.

Настоящее изобретение также относится к препаратам (т.е. водным фармацевтическим композициям) согласно изобретению, используемым в качестве лекарственных препаратов, например, для введения антитела пациенту или для лечения или ослабления симптомов одного или более заболеваний и расстройств, описанных выше.

Настоящее изобретение также относится к способу доставки анти-VEGF антитела пациенту, где указанный способ включает стадию введения пациенту водной фармацевтической композиции согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ введения анти-VEGF антитела согласно изобретению пациенту включает стадии: (i) разведения лиофилизата согласно изобретению с получением водного препарата и (ii) введения водного препарата пациенту. В идеальном случае, стадию (ii) проводят через 24 часа после стадии (i) (например, через 12 часов, через 6 часов, через 3 часа или через 1 час).

Ниже перечислены некоторые конкретные варианты осуществления изобретения.

1) Водная фармацевтическая композиция, включающая (i) по меньшей мере 50 мг/мл анти-VEGF антитела, которое содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно, (ii) сахарозу или трегалозу, (iii) цитратный или гистидиновый буфер, и (iv) полисорбат 80, используемый в качестве поверхностно-активного вещества.

2) Водная фармацевтическая композиция по пункту 1, включающая 4,5-11% (мас./об.) сахарозы или 5-10% трегалозы, 0,006-0,012% (мас./об.) лимонной кислоты, 0,2-0,6% (мас./об.) дигидрата тринатрий-цитрата и 0,01-0,1% (мас./об.) полисорбата 80, где pH указанного препарата составляет приблизительно 6,3-7,3.

3) Водная фармацевтическая композиция по пункту 2, где концентрация сахарозы составляет 6,75% (мас./об.), концентрация лимонной кислоты составляет приблизительно 0,01% (мас./об.), концентрация дигидрата тринатрий-цитрата составляет приблизительно 0,428% (мас./об.), концентрация полисорбата 80 составляет приблизительно 0,05% (мас./об.), а pH составляет приблизительно 6,8.

4) Водная фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-3, где концентрация анти-VEGF

антитела составляет по меньшей мере 60 мг/мл, по меньшей мере 70 мг/мл, по меньшей мере 80 мг/мл, по меньшей мере 90 мг/мл, по меньшей мере 100 мг/мл, по меньшей мере 110 мг/мл, по меньшей мере 120 мг/мл, по меньшей мере 130 мг/мл, по меньшей мере 140 мг/мл или по меньшей мере 150 мг/мл.

5) Водная фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-4, где концентрация анти-VEGF антитела составляет приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл или приблизительно 150 мг/мл.

6) Водная фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-5, где анти-VEGF антитело содержит последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

7) Водная фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-6, где анти-VEGF антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

8) Водная фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-7, где концентрация анти-VEGF антитела составляет приблизительно 60 мг/мл или приблизительно 120 мг/мл.

9) Устройство для доставки, включающее водную фармацевтическую композицию по любому из пунктов 1-8.

10) Устройство для доставки по пункту 9, которое представляет собой предварительно заполненный шприц.

11) Способ доставки анти-VEGF антитела индивидууму, включающий стадию введения индивидууму водной фармацевтической композиции по любому из пунктов 1-8.

12) Способ лечения глазной болезни или глазного расстройства, опосредуемых VEGF, где указанный способ включает введение индивидууму водной фармацевтической композиции по любому из пунктов 1-8.

13) Способ по пункту 12, где указанной глазной болезнью или глазным расстройством является глазное неоваскулярное заболевание.

14) Лиофилизированный препарат, полученный путем лиофилизации водной фармацевтической композиции по любому из пунктов 1-8.

15) Способ получения лиофилизата, включающий стадии: (i) получения водного раствора анти-VEGF антитела, сахарозы или трегалозы, цитратного или гистидинового буфера и поверхностно-активного вещества; и (ii) лиофилизации водного раствора.

16) Способ по пункту 15, где анти-VEGF антитело включает CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

17) Способ по пункту 16, где анти-VEGF антитело включает последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

18) Способ по пунктам 16-17, где анти-VEGF антитело включает последовательность SEQ ID NO: 3.

19) Водная фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-8, используемая для доставки анти-VEGF антитела индивидууму, где указанная доставка включает стадию введения водной фармацевтической композиции индивидууму.

20) Водная фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-8, используемая для лечения глазной болезни или глазного расстройства, опосредуемых VEGF, где такое лечение включает введение водной фармацевтической композиции индивидууму.

21) Применение по пункту 20, где указанной глазной болезнью или глазным расстройством является глазное неоваскулярное заболевание.

Все используемые здесь проценты даны по массе, если это не оговорено особо.

Употребляемые здесь артикли "а" или "ан" означают "один", "по меньшей мере один", либо "один или более", если это не оговорено особо. Если это не противоречит контексту описания изобретения, то артикли, употребляемые с существительными в единственном числе, могут также относиться к существительным во множественном числе.

Содержание любых патентов, патентных заявок и документов, цитируемых в настоящей заявке, во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны для специалиста из представленного здесь описания изобретения и его практического применения. Следует отметить, что представленное описание настоящего изобретения и примеры его осуществления приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение истинного существа и объема изобретения, сформулированных в прилагаемой формуле изобретения и в ее эквивалентах.

Примеры

В нижеследующих примерах описаны исследования по разработке эффективного протокола испытания препарата для осуществления подходящих способов стабилизации и определения состава композиций в целях получения стабильных высококонцентрированных растворов, содержащих антитело 1008, в целях приготовления IVT-препарата, который может храниться в холодильнике по меньшей мере 18 месяцев и удовлетворяет требованиям, утвержденным Регуляторными органами для офтальмических продуктов.

Антитело 1008 представляет собой одноцепочечное антитело, которое связывается с человеческим

васкулярным эндотелиальным фактором роста А (VEGF-A) и ингибирует его биологическую активность. Аминокислотная последовательность экспрессируемого антитела 1008 представляет собой

```
MEIVMTQSPS  TLSASVGRDV  IITCQASEII  HSWLAWYQQK  PGKAPKLLII
LASTLASGVP  SRFSGSGSGA  EFTLTISSLQ  PDDFATYYCQ  NVYLASTNGA
NFGQGTCLTV  LGGGGGSGGG  GSGGGGSGGG  GSEVQLVESG  GGLVQPGGSL
RLSCTASGFS  LTDYYMTWV  RQAPGKGLEW  VGFIDPDDDP  YYATWAKGRF
TISRDN SKNT  LYLQMNSLRA  EDTAVYYCAG  GDHNSGWGLD  IWQGTLVTV  SS (SEQ
ID NO: 4)
```

Значительное количество визуально недетектируемых частиц наблюдалось при концентрации 60 мг/мл антитела 1008, если такое антитело было получено в виде изотонического раствора в 15 мМ цитратного буфера, содержащего 0,001% полисорбата 20 при pH 6,25. Главным недостатком этого исходного препарата является наличие крупных частиц, размер которых превышает установленные Регуляторными органами пределы для офтальмических растворов, вводимых путем инъекции (USP<789>), даже в условиях хранения при температуре -20°C.

В нижеследующих примерах кратко описана разработка препарата, содержащего 60 и 120 мг/мл растворов антитела 1008 для введения в стекловидное тело (IVT), где указанные препараты являются стабильными при хранении при 2-8°C по меньшей мере в течение 18 месяцев. Исследования по разработке препарата были направлены на ингибирование образования визуально недетектируемых частиц с соблюдением требований USP по составу, чистоте и активности данного препарата.

Аналитические методы.

В описанных ниже примерах были применены следующие методы.

Метод визуализации микропотока (ВМП).

ВМП-метод, применяемый для скрининг-анализа наполнителя, и испытание 1 и испытание 2, проводимые для оптимизации при концентрации 60 мг/мл описаны ниже.

Общий объем используемого образца: 0,50 мл.

Объем очистки: 0,20 мл.

Аналитический объем: 0,26 мл.

Стадию оптимизации облучения осуществляли с использованием очищенной отфильтрованной воды, не содержащей частиц.

ВМП-метод применяли для анализа, проводимого в испытании 3 и испытании 4, при концентрации 120 мг/мл антитела.

Общий объем используемого образца: 0,80 мл.

Объем очистки: 0,23 мл.

Аналитический объем: 0,48 мл.

Стадию оптимизации облучения осуществляли с использованием очищенной отфильтрованной воды, не содержащей частиц.

ЭХ-метод.

Разделение белков по размеру осуществляли с помощью ЭХ-ВЭЖХ (эксклюзионной хроматографии). Такое разделение достигалось посредством дифференциального исключения или включения молекул образца по мере их прохождения через стационарную фазу, состоящую из пористых частиц. Система высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяла поддерживать скорость потока 0,25 мл/минуту и температуру образца 4°C и была снабжена колонкой TOSOH SuperSW3000 (Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA) и детектором, работающим на длине волны 214 и 280 нм одновременно. Этот метод был применен для оценки чистоты.

ИО-ВЭЖХ-метод.

АО-ВЭЖХ (анионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография) позволяет разделять белки по их суммарному заряду. Эту процедуру осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), способной поддерживать скорость потока 0,8 мл/минуту и снабженной колоночным отсеком для регуляции температуры (установленной на 25°C), содержащим сильный анионообменник, устройство для автоматического взятия образцов (установленное на 4°C), и УФ-детектор для оценки изменения молекулярных масс, работающий на длине волны 280 нм.

КГЭ-метод.

Капиллярный гель-электрофорез осуществляли в целях оценки идентичности и чистоты белков, имеющих молекулярную массу от 10 до 225 кДа, где указанный электрофорез проводили в ДСН-геле.

Капилляры динамически заполняли патентованным препаратом Beckman Coulter, содержащим 0,2% буфера с ДСН-гелем, pH 8. Разделение белков осуществляли с помощью электрофореза на молекулярных ситах. Логарифм молекулярной массы белка прямо пропорционален его реципрокной электрофоретической подвижности. Идентичность белка определяли путем сравнения его миграции с миграцией белка, имеющего стандартную молекулярную массу. Чистоту определяли путем оценки процента площади под кривой родительского пика и примесей. Для анализа образца использовали детектор на фотодиодной матрице (PDA), работающий на 220 нм.

Анализ на активность.

Оценку активности проводили с помощью ELISA на конкурентное связывание. С помощью ELISA на конкурентное связывание оценивали способность антитела 1008 конкурировать с VEGFR2/Fc за связывание с биотинилированным VEGF. Наблюдаемый сигнал был обратно пропорционален концентрации антитела 1008, на что указывало увеличение количества антитела 1008, эффективно блокирующего связывание биотинилированного VEGF с его рецептором VEGFR2/Fc. Каждый образец анализировали в 96-луночном микротитрационном планшете с использованием антитела 1008 в качестве эталонного стандарта и регистрировали относительную активность образца по сравнению с активностью эталонного стандарта.

Пример 1.

Скрининг-анализ наполнителей.

Антитело 1008 приготавливали в цитратном буфере при pH 6,25. Состав препарата представлен в табл. 1.

Таблица 1

Компонент	Концентрация (масс./об. %)
1008	6%
Тринатрийцитрат (дигидрат)	0,59%
Хлорид натрия	0,73%
Полисорбат 20	0,001%
Соляная кислота	pH 6,25
Вода для инъекций	Дост. кол. до 100

В вышеуказанном препарате наблюдалось значительное количество визуально недетектируемых частиц. Размер крупных частиц превышает установленные Регуляторными органами пределы для офтальмических растворов, вводимых путем инъекции (USP<789>), даже в условиях хранения при -20°C.

Влияние различных наполнителей на образование визуально недетектируемых частиц оценивали в целях разработки более стабильного жидкого раствора антитела 1008. Растворы белка с концентрацией 60 мг/мл, содержащие различные наполнители, хранили при 40°C и анализировали на присутствие частиц размером 1-100 мкм с помощью ВМП. Экспериментальные данные показали, что большинство тестируемых наполнителей, включая аргинин, декстран, аскорбиновую кислоту, метионин и ацетат аммония, не снижали степень образования частиц. Значительное снижение степени образования частиц наблюдалось только в присутствии невосстанавливающих Сахаров, таких как сахароза и трегалоза.

Был проведен дополнительный скрининг-анализ наполнителей. Влияние наполнителей на стабильность антитела 1008 оценивали в ~60 мг/мл раствора антитела 1008. Растворы белка, содержащие 0,1% альбумина человеческой сыворотки (HSA), 0,1% полоксамера 407, 0,1% Brij 35, 3% глицерина, 50 мМ глицина, хранили при 40°C, и образцы анализировали с помощью ВМП, ЭХ и ИОХ после хранения в течение 8, 21 и 28 дней. Результаты представлены в таблице 2. Экспериментальные данные указывали на нестабильность белка в присутствии тестируемых наполнителей.

Таблица 2. Результаты скрининг-анализа наполнителей

Наполнитель	0,1% HSA	0,1% полоксамера 407	0,1% Brij 35	3% глицерина	50 мМ глицина
Время (дни)	8				
≥10 мкм по ВМП	19	8	18	329	47
≥25 мкм по ВМП	5	5	6	43	8
≥50 мкм по ВМП	1	0	1	3	0
Всего по ВМП	538	381	378	24805	2436

ЭХ (% от базовой величины)	96,2	95,5	81,8	96,3	95,8
ИОХ (% от базовой величины)	95,1	94,3	82,7	95,0	95,6
Время (дни)	21				
≥10 мкм по ВМП	30	5	12	95	36
≥25 мкм по ВМП	7	0	5	14	10
≥50 мкм по ВМП	1	0	0	2	1
Всего по ВМП	495	197	1091	5622	1037
ЭХ (% от базовой величины)	88,2	87,7	63,2	89,4	89,4
ИОХ (% от базовой величины)	87,8	86,1	63,2	87,9	87,1
Время (дни)	28				
≥10 мкм по ВМП	69	382	595	365	466
≥25 мкм по ВМП	21	39	68	65	72
≥50 мкм по ВМП	5	4	6	9	15
Всего по ВМП	505	7718	2208	10690	52375
ЭХ (% от базовой величины)	85,7	84,7	65,3	86,1	84,5
ИОХ (% от базовой величины)	82,7	80,9	60,0	83,4	82,3

Стабильность антитела 1008 в концентрации 57 мг/мл оценивали в 20 мМ фосфатного буфера при pH 6,25. Препарат, содержащий 9% сахарозу и 0,1% PS80, анализировали на 6, 14 и 27 дни после хранения при 40°C. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Стабильность 57 мг/мл 1008 в 20 мМ фосфатного буфера

Время при 40°C (дни)	6	14	27
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	43	42	11
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	3	13	3
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	1	4	0
Всего по ВМП (#/мл)	1418	1650	425
ЭХ (% от базовой величины)	97,3	91,9	82,1
ИОХ % от базовой величины)	98,3	92,2	79,2

Пример 2.

Разработка нового препарата.

Испытание 1.

Скрининг-анализ наполнителей.

Для приготовления образцов использовали раствор 60 мг/мл белка 1008 в 20 мМ цитратного буфера, содержащего 0,001% полисорбата 20 и 0,73% NaCl при pH 6,25. Для удаления поверхностно-активного вещества, присутствующего в исходном растворе белка, сначала осуществляли буферный обмен на колонке NAP-25 с использованием носителя, не содержащего полисорбата 20. После этого, замененный раствор белка концентрировали приблизительно до 60 мг/мл с использованием фильтра Vivaspin с отсечкой молекулярной массы 10 кДа. Затем по отдельности добавляли наполнители, такие как HSA, глицин, глицерин, полоксамер 407 и Brij 35. Полученные образцы фильтровали с помощью шприца через 0,2 мкм-мембрану из ПВДФ в 4-миллилитровый стеклянный прозрачный сосуд. Для предварительного анализа использовали приблизительно 100 мкл образца, а остальные образцы оставляли на хранение при 40°C. Один миллилитр образца каждого препарата брали через 8, 21 и 28 дней после хранения при 40°C для анализа, проводимого с помощью ВМП, ЭХ и ИОХ.

Отбор компонентов, таких как буфер, сахар и поверхностно-активное вещество.

При проведении внутренних испытаний путем скрининг-анализа наполнителей, для отбора компо-

нентов препарата брали два буфера (цитрат и гистидин), два сахара (сахарозу и трегалозу) и два поверхностно-активных вещества (полисорбат 20 и полисорбат 80). В данном испытании, концентрация буфера составляла 20 мМ, концентрация сахара составляла 264 мМ, а концентрация поверхностно-активного вещества составляла 0,1%. Протокол полного факторного эксперимента представлен ниже в таблице.

Таблица 4. Факторы и состав для испытания 1

Фактор	Состав
Буфер	20 мМ цитрата или 20 мМ гистидина
Сахар	264 мМ (9%) сахарозы или 264 мМ (9%) трегалозы
Поверхностно-активное вещество	0,1% полисорбата 20 или 0,1% полисорбата 80

Используемый полный протокол представлен ниже в табл. 5.

Таблица 5. Полный факторный эксперимент с тремя компонентами для испытания 1

No	Буфер (мМ)	Сахар	Поверхностно-активное вещество
1	20 мМ цитрата	264 мМ трегалозы	0,1% PS 20
2	20 мМ цитрата	264 мМ трегалозы	0,1% PS 80
3	20 мМ цитрата	264 мМ сахарозы	0,1% PS 20
4	20 мМ цитрата	264 мМ сахарозы	0,1% PS 80
5	20 мМ гистидина	264 мМ трегалозы	0,1% PS 20
6	20 мМ гистидина	264 мМ трегалозы	0,1% PS 80
7	20 мМ гистидина	264 мМ сахарозы	0,1% PS 20
8	20 мМ гистидина	264 мМ сахарозы	0,1% PS 80

Другие параметры.

Концентрация/рН	50–60 мг/мл 1008 при рН 6,25
Буферный обмен	Колонка NAP25, концентрат, отфильтрованный на Vivaspin с отсечкой молекулярной массы 10 кДа
Размер образца/пкг	2–2,5 мл в прозрачном стеклянном 4 мл-сосуде с завинчивающейся крышкой
Хранение/взятие образцов	40°C/0, 1, 2 и 4 недели
Анализ	ВМП, ЭХ и ИОХ

Для приготовления образцов использовали раствор 60 мг/мл белка 1008 в исходном буфере, содержащем 0,001% полисорбата 20. Для этого приготавливали четыре новых буферных носителя с различными комбинациями буферов/сахаров (20 мМ цитрата/264 мМ трегалозы, 20 мМ цитрата/264 мМ сахарозы, 20 мМ гистидина/264 мМ трегалозы, 20 мМ гистидина/264 мМ сахарозы). Сначала лекарственное вещество 1008 (ЛВ) подвергали буферному обмену с использованием носителей на колонке Illustra NAP-25 (GE Healthcare). Колонку уравнивали 25 мл цитратного буфера. Затем в колонку загружали 2 мл ЛВ 1008. После полного прохождения раствора ЛВ через колонку, эту колонку промывали 2 мл того же самого буфера, который использовали для уравнивания колонки, 6 мл раствора, элюированного с колонки, собирали в концентратор Vivaspin 6 (с отсечкой молекулярной массы 10 кД, GE Healthcare). 6 мл элюированного раствора концентрировали приблизительно до 2 мл на центрифуге Beckman GS-15R при 9384× g и 4°C. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 при OD280. В препараты добавляли полисорбат 20 (PS20) или полисорбат 80 (PS80) до конечной концентрации 0,1%. Полученные препараты фильтровали с помощью шприца через 0,2 мкм-мембрану из ПВДФ, и этими препаратами заполняли 4-миллилитровый прозрачный стеклянный сосуд. Для предварительного анализа использовали приблизительно 100 мкл образца, а остальные образцы хранили при 40°C. Один миллилитр образца каждого препарата брали через 1, 2 и 4 недели после хранения при 40°C для анализа, проводимого с помощью ВМП, ЭХ и ИОХ.

Для отбора оптимальных компонентов препарата, таких как сахар/поверхностно-активное вещество/буфер, проводили анализ на качество препаратов. В протоколе эксперимента, обсуждаемого выше, использовали два буфера (цитрат и гистидин), два сахара (сахарозу и трегалозу) и два поверхностно-активных вещества (полисорбат 20 и полисорбат 80). Испытания на стабильность, проводимые в течение четырех недель, осуществляли в более жестких условиях (40°C). Стабильность образцов оценивали с

помощью ЭХ, ИОХ и ВМП. В табл. 6 представлены результат анализа на стабильность по ЭХ, ИОХ и температуре плавления (T_m), оцениваемой по микро-ДСК.

Таблица 6. Качественный анализ факторов для 60 мг/мл 1008 при 40°C

No	1 нед./40° С (ЭХ) *	2 нед./40° С (ЭХ)	4 нед./40° С (ЭХ)	1 нед./40° С (ИОХ) *	2 нед./40° С (ИОХ)	4 нед./40° С (ИОХ)	T_m (°C) по микро- ДСК
1	2,9	10,7	26,6	5,0	13,7	20,2	71,53
2	2,4	7,8	18,3	4,2	10,5	13,6	71,97
3	2,9	11,1	27,1	4,9	13,2	17,5	71,41
4	2,3	7,5	20,9	4,1	10,6	11,7	71,97
5	3,2	11,7	26,8	5,6	14,7	23,4	71,66
6	2,7	8,1	19,1	5,1	12,1	19,9	72,28
7	3,5	13,2	31,4	6,1	16,4	25,2	71,53
8	2,8	8,6	21,2	5,4	13,1	15,1	72,15

* % потерь, оцениваемый по относительной площади пиков.

Результаты стабильности анализировали с использованием компьютерной программы Minitab (Minitab Inc., State College PA). Поскольку ЭХ и ИОХ давали аналогичные результаты, то анализировали только ЭХ-данные, и эти данные регистрировали с помощью компьютерной программы Minitab. Результаты, полученные с помощью ЭХ, показали, что единственным значимым фактором является поверхностно-активное вещество, а другими факторами, которые, очевидно, влияют на ответ, являются буфер и взаимодействие буфера и сахара (в меньшей степени). ЭХ-данные позволяют предположить, что оптимальным компонентом для препарата являются цитрат, который служит в качестве буфера, полисорбат 80, который служит в качестве поверхностно-активного вещества, и сахароза, которая служит в качестве сахара.

Результаты экспериментов по обнаружению частиц методом ВМП также анализировали с помощью компьютерной программы Minitab. Как оказалось, все три оцениваемых фактора (сахар, поверхностно-активное вещество и буфер) не дали значимых результатов ($\alpha=0,05$). При проведении сравнения основных эффектов влияния этих факторов на частицы было обнаружено, что цитрат был лучше, чем гистидин; PS80 был лучше, чем PS20; а сахароза обладала таким же свойством, как трегалоза или была даже несколько более эффективной. Следовательно, для проведения последующих испытаний, в качестве буфера использовали цитрат, в качестве поверхностно-активного вещества использовали полисорбат 80, а в качестве сахара использовали сахарозу.

Испытание 2.

Оптимизация концентраций для буфера, сахара и поверхностно-активного вещества.

Полный факторный эксперимент, включающий три фактора на двух уровнях с двумя центральными точками, осуществляли в цитратном и гистидиновом буферах, соответственно, для определения оптимальной концентрации для каждого выбранного компонента. Такими тремя факторами являются буфер (цитратный или гистидиновый), полисорбат 80 и сахароза. Факторы и общий протокол эксперимента представлены в табл. 7, а подробный протокол эксперимента представлен в табл. 8 и 9.

Таблица 7. Факторы и протокол испытания 2

Фактор	Протокол	
Цитратный буфер	10–20 мМ	NA
Гистидиновый буфер	Не анализировали	10–20 мМ
Полисорбат 80	0,001–0,1%	0,001–0,1%
Сахароза	4,5–9%	4,5–9%

Таблица 8. Протокол полного факторного эксперимента в цитратном буфере

Порядковый номер испытания	Буфер (мМ)	Сахароза (%)	Полисорбат 80 (%)
C1	10	4,5	0,001
C2	20	4,5	0,001
C3	10	9	0,001
C4	20	9	0,001
C5	10	4,5	0,1
C6	20	4,5	0,1
C7	10	9	0,1
C8	20	9	0,1
C9	15	6,75	0,0505
C10	15	6,75	0,0505

Таблица 9. Протокол полного факторного эксперимента в гистидиновом буфере
(3 фактора на 2 уровнях с 2 центральными точками)

Порядковый номер испытания	Буфер (мМ)	Сахароза (%)	Полисорбат 80 (%)
H1	10	4,5	0,001
H2	20	4,5	0,001
H3	10	9	0,001
H4	20	9	0,001
H5	10	4,5	0,1
H6	20	4,5	0,1
H7	10	9	0,1
H8	20	9	0,1
H9	15	6,75	0,0505
H10	15	6,75	0,0505

Для приготовления отдельного препарата использовали раствор 60 мг/мл белка 1008 в цитратном буфере, содержащем 0,001% полисорбата, 20/0,73% NaCl при pH 6,25. Сначала этот раствор подвергали буферному обмену с использованием носителей на колонке NAP-25. Этот носитель содержал буфер и сахарозу в их целевых концентрациях. Раствор белка, подвергнутый буферному обмену, концентрировали до концентрации приблизительно 60 мг/мл на фильтре Vivaspin с отсечкой молекулярной массы 10 кД.

Затем добавляли дозируемые количества полисорбата 80 и хлорида натрия до достижения конечного состава препарата. Концентрацию белка в каждом образце подтверждали путем вычисления теоретического коэффициента экстинкции по оптической плотности, измеренной в УФ-области на длине волны 280 нм.

Затем, полученные препараты фильтровали с помощью шприца через 0,2 мкм-мембрану из ПВДФ в 4-миллилитровый стеклянный прозрачный сосуд. Для предварительного анализа, проводимого с помощью ЭХ и ИОХ, использовали приблизительно 100 мкл-образца, а остальные приблизительно 2-2,5 мл-образцы хранили при 40°C. Приблизительно 600 мкл образца брали после хранения в течение 11, 20 и 27 дней при 40°C для анализа, проводимого методами ВМП, ЭХ и ИОХ.

Исходя из результатов Испытания 1, полный факторный эксперимент, включающий три фактора на двух уровнях с двумя центральными точками, осуществляли в цитратном и гистидиновом буферах, соответственно, для определения оптимальной концентрации для каждого выбранного компонента препарата. Тестируемые образцы хранили при 40°C, а затем их брали через 0, 1,6, 2,9 и 4 недели для анализа, проводимого методами ВМП, ЭХ и ИОХ. Результаты представлены в табл. 10 и 11.

Таблица 10. Результаты анализов на стабильность забуференных цитратом растворов

Время (недели)	0	1,6	2,9	4	0	1,6	2,9	4
Условия	10 мМ цитрата/4,5% сахарозы/0,001% PS80)				20 мМ цитрата/4,5% сахарозы/0,001% PS80			
1008 (мг/мл)	59,1				58,7			
Частицы ≥10 мкм #/мл по ВМП	–	61,1	91,7	36518	–	27	203	51209
Частицы ≥25 мкм #/мл по ВМП	–	7,64	15,29	6508	–	4	27	5071
Частицы ≥50 мкм #/мл по ВМП	–	0	0	325	–	0	4	61
Все частицы #/мл по ВМП	–	2881	7165	82439	–	627	26078	57734 5
ЭХ (% от базовой величины)	99,2	93,4	89,6	85,8	99,3	93,8	90,1	86,4
ИОХ (% от базовой величины)	97,7	91,4	85,3	81,4	96,8	92,7	87,2	83,3
Условия	10 мМ цитрата/9% сахарозы/0,001% PS80				20 мМ цитрата/9% сахарозы/0,001% PS80			
1008 (мг/мл)	54,2				53,3			
Частицы ≥10 мкм #/мл по ВМП	–	38	57	84	–	19	42	126
Частицы ≥25 мкм #/мл по ВМП	–	4	0	8	–	8	0	11
Частицы ≥50 мкм #/мл по ВМП	–	0	0	0	–	0	0	0
Все частицы #/мл по ВМП	–	791	1838	6993	–	841	1594	8472
ЭХ (% от базовой величины)	99,2	93,5	89,7	86,2	99,5	93,4	89,9	86,5
ИОХ (% от базовой)	97,5	91,1	85,3	81,4	97,4	91,8	86,3	82,6

величины)								
Условия	10 мм цитрата/4,5% сахарозы/0,1% PS80				20 мм цитрата/4,5% сахарозы/0,1% PS80			
1008 (мг/мл)	58,7				58,7			
Частицы ≥10 мкм #/мл по ВМП	–	76	27	31	–	34	149	187
Частицы ≥25 мкм #/мл по ВМП	–	0	4	8	–	11	31	31
Частицы ≥50 мкм #/мл по ВМП	–	0	0	0	–	4	0	0
Все частицы #/мл по ВМП	–	1104	803	23839	–	860	1494	31451
ЭХ (% от базовой величины)	99,2	92,4	87,5	82,3	99,5	92,3	87,4	82,5
ИОХ (% от базовой величины)	97,5	90,2	83,1	78,0	97,5	90,6	84,0	78,8
Условия	10 мм цитрата/9% сахарозы/0,1% PS80				20 мм цитрата/9% сахара/0,1% PS80			
1008 (мг/мл)	54,7				52,5			
Частицы ≥10 мкм #/мл по ВМП	–	103	187	164	–	88	65	99
Частицы ≥25 мкм #/мл по ВМП	–	23	42	27	–	23	11	19
Частицы ≥50 мкм #/мл по ВМП	–	0	4	2	–	0	4	0
Все частицы #/мл по ВМП	–	2538	3642	4055	–	1062	1613	2117
ЭХ (% от базовой величины)	98,9	93,2	88,5	84,0	99,4	92,8	88,3	84,0
ИОХ (% от базовой величины)	97,2	90,9	83,8	79,1	97,1	91,3	84,3	79,7
Условия	15 мм цитрата/6,75% сахарозы/0,0505% PS80				15 мм цитрата/6,75% сахарозы/0,0505% PS80			
1008 (мг/мл)	50,8				51,3			
Частицы ≥10 мкм #/мл по ВМП		42	54	42		31	15	
Частицы ≥25 мкм #/мл по ВМП		8	8	0		4	4	
Частицы ≥50 мкм #/мл по ВМП		0	4	0		0	0	
Все частицы #/мл по ВМП		439	1368	1536		1162	1727	
ЭХ (% от базовой величины)	99,1	93,6	88,8	84,7	99,4	92,9	88,3	84,1
ИОХ (% от базовой величины)	97,0	91,5	85,0	80,6	97,0	91,4	84,7	80,0

Таблица 11. Результаты анализов на стабильность забуференных гистидином растворов

Время (недели)	0	1,6	2,9	4	0	1,6	2,9	4
Условия	10 мМ гистидина/4,5% сахарозы/0,001% PS80				20 мМ гистидина/4,5% сахарозы/0,001% PS80			
1008 (мг/мл)	48,8				50,6			
Частицы ≥ 10 мкм #/мл по ВМП	–	26,75	152,86	596		30,57	95,54	4265
Частицы ≥ 25 мкм #/мл по ВМП	–	15,29	11,46	76,43		0	7,64	172
Частицы ≥ 50 мкм #/мл по ВМП	–	0	0	7,64		0	0	3,82
Все частицы #/мл по ВМП	–	634	2927	42083		592	14204	246370
ЭХ (% от базовой величины)	99,6	93,4	89,5	85,9	99,6	93,3	89,6	86,4
ИОХ (% от базовой величины)	96,7	91,9	86,2	82,5	96,9	91,9	86,2	82,4
Условия	10 мМ гистидина/9% сахарозы/0,001% PS80				20 мМ гистидина/9% сахарозы/0,001% PS80			
1008 (мг/мл)	54,8				55,6			
Частицы ≥ 10 мкм #/мл по ВМП		19,11	64,97	202,54		15,29	103,18	149,04
Частицы ≥ 25 мкм #/мл по ВМП		7,64	7,64	26,75		0	15,29	15,29
Частицы ≥ 50 мкм		0	0	0		0	11,46	3,82

#/мл по ВМП								
Все частицы #/мл по ВМП		684	2538	7505		806	3565	8102
ЭХ (% от базовой величины)	99,7	92,8	88,9	85,5	98,8	93,4	89,5	85,9
ИОХ (% от базовой величины)	97,0	90,78	84,8	81,1	97,1	90,6	84,4	80,3
Условия	10 мм гистидина/4,5% сахарозы/0,1% PS80				20 мм гистидина/4,5% сахарозы/0,1% PS80			
1008 (мг/мл)	48,8				49,8			
Частицы ≥10 мкм #/мл по ВМП	–	68,8	76,4	126		34	42	54
Частицы ≥25 мкм #/мл по ВМП	–	15,3	3,82	19,1		0	4	8
Частицы ≥50 мкм #/мл по ВМП	–	7,64	0	0		0	4	0
Все частицы #/мл по ВМП	–	753	2033	2782		1311	1704	1724
ЭХ (% от базовой величины)	99,7	92,7	87,6	83,9	99,7	92,7	88,0	83,8
ИОХ (% от базовой величины)	96,9	90,7	84,5	78,7	97,0	91,0	84,4	78,1
Условия	10 мм гистидина/9% сахарозы/0,1% PS80				20 мм гистидина/9% сахарозы/0,1% PS80			
1008 (мг/мл)	54,1				54,6			
Частицы ≥10 мкм #/мл по ВМП		22,93	42,04	68,79		64,97	72,61	80,25
Частицы ≥25 мкм #/мл по ВМП		3,82	3,82	0		0	7,64	3,82
Частицы ≥50 мкм #/мл по ВМП		0	0	0		0	0	3,82
Все частицы #/мл по ВМП		783	1330	6111		1716	2469	3844
ЭХ (% от базовой	99,3	92,8	88,2	84,0	99,7	92,7	87,6	83,3

величины)								
ИОХ (%) от базовой величины)	97,0	90,5	83,4	78,7	96,8	90,9	83,3	78,3
Условия	15 мМ гистидина/6,75% сахарозы/0,0505% PS80				15 мМ гистидина/6,75% сахарозы/0,0505% PS80			
1008 (мг/мл)	50,3				49,6			
Частицы ≥ 10 мкм #/мл по ВМП		19	46	172		31	80	114
Частицы ≥ 25 мкм #/мл по ВМП		0	0	19		7,6	15,3	22,9
Частицы ≥ 50 мкм #/мл по ВМП		0	0	0		0	7,6	3,8
Все частицы #/мл по ВМП		1005	1788	4242		760	1823	3053
ЭХ (%) от базовой величины)	99,3	92,9	87,9	84,2	99,6	92,5	87,7	83,9
ИОХ (%) от базовой величины)	97,1	90,9	84,3	79,6	96,9	91,0	84,6	79,8

Экспериментальные данные анализировали с помощью компьютерной программы Minitab. Результаты ЭХ-анализа в цитратном буфере показали, что поверхностно-активное вещество является главным фактором, влияющим на агрегацию белка, а сахаразы, взаимодействие сахаразы и полисорбата 80 и ионная сила буфера играют менее важную роль. Чем выше концентрация сахаразы и ниже концентрация полисорбата 80, тем выше стабильность белка. Агрегация почти не влияет на стабильность белка, а более высокая ионная сила цитратного буфера немного повышает стабильность белка.

Результаты ВМП-анализа в цитратном буфере показали, что такие факторы, как сахараза и полисорбата 80, а также взаимодействие сахаразы и полисорбата 80 играют одинаково важную роль в образовании частиц. Высокая концентрация сахаразы и полисорбата 80 способствует значительному ингибированию образования частиц, тогда как ионная сила буфера в пределах 10-20 мМ почти не влияет на образование частиц, при этом предпочтительно, чтобы ионная сила буфера была снижена.

Результаты Minitab-анализа растворов гистидинового буфера показали, что поверхностно-активное вещество полисорбат 80 является главным фактором, влияющим на агрегацию белка, а взаимодействие буфера и полисорбата 80, а также сахараза играют менее важную роль. Чем меньше концентрация полисорбата 80, тем выше стабильность белка. Ионная сила буфера и концентрация сахаразы не влияют на агрегацию белка.

Результаты ВМП-анализа в гистидиновом буфере показали, что полисорбат 80, сахараза и взаимодействие сахаразы и полисорбата 80, играют значительную роль в образовании частиц. Для ингибирования образования частиц предпочтительными являются высокая концентрация сахаразы, низкая концентрация полисорбата 80 и низкая ионная сила буфера.

Оптимизация pH.

Было проведено исследование влияния pH на характер агрегации антитела 1008 при шести значениях pH (5,0, 6,0, 6,25, 6,50, 6,75 и 7,0) в 15 мМ цитратного буфера, содержащего 0,1% NaCl, 6,75% сахаразы и 0,05% PS80. Сначала лекарственное вещество 1008 (ЛВ) подвергали буферному обмену с использованием носителей (без PS80) при различных pH на колонке Illustra NAP-25 (GE Healthcare). Колонку сначала уравнивали 15 мл цитратного буфера. Затем в колонку загружали 1 мл ЛВ 1008. После полного прохождения раствора ЛВ через колонку, эту колонку промывали 2 мл того же цитратного буфера, который использовали для уравнивания колонки. 2 мл раствора, элюированного с колонки, собирали в концентратор Vivaspin 2 (с отсечкой молекулярной массы 10 кД, GE Healthcare). 2 мл элюированного раствора концентрировали приблизительно до 1 мл на центрифуге Beckman GS-15R при 9384× g и 4°C. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000. Конечная концентрация 1008 в данном испытании составляла приблизительно 70 мг/мл. В препараты добавляли PS80 до конечной целевой концентрации 0,05%. Кинетический анализ на мутность проводили на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35, снабженном двухпозиционным держателем для ячеек и содержащим водную фракцию для

регуляции температуры. В кварцевую ячейку с субмикронным объемом Starna (Starna Scientific Ltd., England) и длиной пути 1 см добавляли 250 мкл препарата 1008 или соответствующего носителя. Ячейки находились в специальном держателе, предварительно нагретом до 55°C. Затем проводили мониторинг изменения OD₃₅₀ в препарате 1008 в течение 120 минут. После этого строили график зависимости OD₃₅₀ для препаратов с различными pH от времени.

С помощью кинетического анализа на мутность проводили исследование влияния pH на характер агрегации 1008, где указанные препараты имели pH от 5,0 до 7,0 и содержали приблизительно 70 мг/мл 1008. В анализе на мутность, резкое увеличение OD₃₅₀ ассоциировалось с высоким уровнем агрегации белка. Таким образом, различие во времени инкубирования, необходимое для повышения OD₃₅₀ каждого препарата, может влиять на физическую стабильность белка в препаратах. Как показано на фиг. 1, препарат 1008, очевидно, является наиболее стабильным при pH 6,75 в условиях тестирования препарата, и при самом длительном времени инкубирования наблюдалось самое резкое увеличение OD₃₅₀. Повторные эксперименты с аналогичными результатами подтвердили, что тестируемый препарат является наиболее стабильным при pH 6,75.

Испытание 3.

Эффекты наполнителей и высоких концентраций активного вещества.

Факторный эксперимент с полурепликами (табл. 12) проводили для исследования влияния основных факторов на качество препарата, включая концентрацию белка (60-120 мг/мл), сахарозы (4,5-9,0%), цитратного буфера (10-20 мМ) и полисорбата 80 (0,01-0,1%).

Таблица 12. Протокол эксперимента для испытания 3

Порядковый номер испытания	Центральные точки	Партии	1008 (мг/мл)	Сахароза (масс. %)	Буфер (мМ)	Полисорбат 80 (%)
1	1	1	60	4, 5	10	0, 01
2	1	1	120	4, 5	10	0, 1
3	1	1	60	9	10	0, 1
4	1	1	120	9	10	0, 01
5	1	1	60	4, 5	20	0, 1
6	1	1	120	4, 5	20	0, 01
7	1	1	60	9	20	0, 01
8	1	1	120	9	20	0, 1
9	0	1	90	6, 75	15	0, 055
10	0	1	90	6, 75	15	0, 055

Для приготовления вышеуказанных препаратов, сначала получали 20% цитратный буфер при pH 6,5 и 30% маточный раствор сахарозы в 20 мМ цитратного буфера при pH 6,5. Затем цитратный буфер, маточный раствор сахарозы и воду для инъекций смешивали в соответствующих отношениях и получали пять буферов с PS80, а именно, 4,5% сахарозы в 10 мМ цитрата, 9% сахарозы в 10 мМ цитрата, 4,5% сахарозы в 20 мМ цитрата, 9% сахарозы в 20 мМ цитрата и 6,75% сахарозы в 15 мМ цитрата. После этого ЛВ 1008 подвергали буферному обмену с использованием пяти буферов на колонке Illustra NAP-25 (GE Healthcare), после чего концентрировали на концентраторе Vivaspin 6 (с отсечкой молекулярной массы 5 кД, GE Healthcare) при 8000× g и при 5°C. Концентрации белка в каждом образце определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 во время центрифугирования. Для получения образцов в первых четырех буферах, когда концентрация 1008 достигала ~70 мг/мл, часть образца удаляли из концентратора и использовали для получения препаратов (#1, 3, 5 и 7 в таблице 12) с 60 мг/мл API путем добавления нужного количества соответствующего буфера и его смешивания с 10% PS80. Остальные образцы снова концентрировали до достижения концентрации более 130 мг/мл, а затем добавляли буфер и 10% PS80 с получением конечных препаратов (#2, 4, 6 и 8 в табл. 12). Препараты #9 и 10, представленные в табл. 12, получали путем концентрирования образцов 1008, подвергнутых буферному обмену #5 приблизительно до 108 мг/мл, а затем эти препараты смешивали с буфером и 10% PS80 до получения конечных концентраций препарата. Затем определяли величины pH всех конечных препаратов и доводили их до 6,5.

Анализ на мутность, т.е. один из описанных выше анализов, который был модифицирован, служил в качестве аналитического средства для оценки. В этом модифицированном анализе на мутность использовали спектрофотометр, работающий в диапазоне УФ и видимого света Cary 100 и снабженный 12 ячейками. В этом анализе использовали кварцевые кюветы 1 мм с крышками. Для проведения теста, в каждую кювету добавляли 300 мкл образца. Затем проводили мониторинг изменения оптической плотности на 360 нм для препаратов, инкубированных при 55°C.

Эффекты наполнителей и высоких концентраций активного вещества.

Концентрации препарата 1008 и конечные pH всех препаратов, измеренные в испытании 3, систе-

матизированы в табл. 13. Препараты с низкими, средними и высокими концентрациями 1008 (таблица 4.3.1.-1) и с различными концентрациями сахарозы и PS80, а также с различными ионными силами буферов, инкубировали при 55°C и проводили мониторинг изменений OD₃₆₀. Как показано на фиг. 2, для этих препаратов наблюдались различные тенденции к агрегации. Два препарата агрегировались почти сразу после начала инкубирования, и такими препаратами являются препараты 2 и 6, имеющие относительно более высокую концентрацию 1008 (~120 мг/мл) и более низкую концентрацию сахарозы (4,5%). С другой стороны, препараты 3 и 7, имеющие относительно более низкую концентрацию 1008 (~60 мг/мл) и более высокую концентрацию сахарозы (9%), агрегировались медленнее, чем другие препараты. Тенденция к агрегации препаратов двух вышеуказанных групп снижалась при других комбинациях, таких как средняя концентрация препарата 1008 и сахарозы.

Таблица 13. Конечные условия для приготовления препарата в Испытании 3

Препарат #	Концентрация наполнителя	Конечная концентрация 1008 (мг/мл)	Конечный pH
1	10 мМ цитрата/4,5% сахарозы/0,01% PS80	58,223 (низкая)	6,56
2	10 мМ цитрата/4,5% сахарозы/0,1% PS80	113,554 (высокая)	6,53
3	10 мМ цитрата/9% сахарозы/0,1% PS80	59,034 (низкая)	6,55
4	10 мМ цитрата/9% сахарозы/0,01% PS80	117,489 (высокая)	6,48
5	20 мМ цитрата/4,5% сахарозы/0,1% PS80	58,910 (низкая)	6,53
6	20 мМ цитрата/4,5% сахарозы/0,01% PS80	116,712 (высокая)	6,50
7	20 мМ цитрата/9% сахарозы/0,01% PS80	57,431 (низкая)	6,47
8	20 мМ цитрата/9% сахарозы/0,1% PS80	116,466 (высокая)	6,45
9	15 мМ цитрата/6,75% сахарозы/0,055% PS80	87,555 (средняя)	6,48
10	15 мМ цитрата/6,75% сахарозы/0,055% PS80	87,769 (средняя)	6,49

С использованием в качестве критерия время для достижения OD₃₆₀ до 0,25 для каждого препарата проводили сравнение эффектов различных факторов, влияющих на препарат. Полученные результаты позволяют предположить, что сахароза оказывает наибольшее влияние на агрегацию 1008, а за ней следует концентрация API. Эффекты концентрации сахарозы и концентрации API имели противоположную тенденцию, что указывает на то, что более высокая концентрация сахарозы и более низкая концентрация API являются предпочтительными для повышения стабильности препарата. Другие два фактора, а именно ионная сила буфера и PS80, давали меньший эффект.

Испытание 4.

Дополнительное испытание на эффекты концентраций активного вещества и сахарозы.

На основании результатов, полученных в вышеописанном Испытании 3, было проведено испытание 4 для дополнительного исследования эффектов концентрации белка (60-120 мг/мл) и концентрации сахарозы (в более узком интервале от 6 до 9%) в 15 мМ цитратного буфера, содержащего 0,05% PS80 при pH 6,50. Протокол испытаний представлен ниже в таблице.

Таблица 14. Протокол испытания 4

Порядковый номер испытания	Центральные точки	Партии	1008 (мг/мл)	Сахароза (масс. %)
1	1	1	60	6
2	1	1	120	6
3	1	1	60	9
4	1	1	120	9
5	-1	1	47,6	7,5
6	-1	1	132,4	7,5
7	-1	1	90	5,4
8	-1	1	90	9,6
9	0	1	90	7,5
10	0	1	90	7,5
11	0	1	90	7,5
12	0	1	90	7,5

Для получения препаратов, приблизительно 80 г лекарственного вещества 1008 загружали в систему TFF, а затем подвергали буферному обмену путем замены на 15 мМ цитратного буфера, содержащего 6% сахарозы в объеме, приблизительно в 5 раз превышающем объем лекарственного вещества. После буферного обмена, объем раствора белка снижали приблизительно до половины от его первоначального объема с использованием системы TFF. В результате получали приблизительно 44 г концентрированного раствора 1008, в котором количество концентрированного белка составляло приблизительно 112 мг/мл, как было измерено на спектрофотометре NanoDrop 2000. Затем концентрированный раствор 1008 использовали для получения препаратов #1, 3, 5, 7-12 путем смешивания с соответствующим количеством 10% PS80 и 15 мМ цитратного буфера, содержащего 0, 6% и/или 40% сахарозы, в результате чего получали соответствующие конечные концентрации API, сахарозы и PS80 в каждом из этих препаратов. Остальную часть раствора 1008 дополнительно концентрировали тем же самым способом с получением приблизительно 132 мг/мл препаратов #2 и 4. И наконец, препарат #6 получали путем концентрирования раствора 1008 приблизительно до 171 мг/мл, и концентрации белка, сахарозы и PS80 корректировали путем добавления 10% PS80 и 15 мМ цитратного буфера, содержащего 0,6 и/или 40% сахарозы. Конечную концентрацию 1008 в каждом препарате определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 и pH доводили до 6,5.

Образцы анализировали с помощью описанного выше анализа на мутность. Восемь отобранных препаратов (#1-4 и #7-10) также хранили в экспериментальном инкубаторе при 40°C в течение 6 недель и анализировали методами ВМП, ИОХ и ЭХ в различные периоды времени.

Было проведено исследование 12 препаратов, перечисленных в табл. 15.

Таблица 15. Конечные условия получения препарата и T_m в анализе на мутность, проводимом в испытании 4

Препарат #	Концентрация сахарозы	Конечная концентрация 1008 (мг/мл)	Конечный pH	T _m (минуты)
1	6%	61,6	6,49	62,0
2	6%	122,8	6,49	27,4
3	9%	60,0	6,50	86,3
4	9%	119,0	6,51	34,2
5	7,5%	47,7	6,50	97,0
6	7,5%	134,5	6,50	24,2
7	5,38%	94,6	6,50	33,1
8	9,62%	86,2	6,50	49,4
9	7,5%	91,7	6,50	41,2
10	7,5%	89,5	6,50	44,5
11	7,5%	88,4	6,48	38,6
12	7,5%	90,1	6,52	40,0

Для мониторинга агрегации препаратов проводили анализ на мутность при 55°C. Как показано на фиг. 3, различные степени агрегации препаратов наблюдались в одних и тех же условиях температурного стресса. Препараты, имеющие относительно высокие концентрации 1008 и низкие концентрации сахаро-

зы (такие как препараты #2 и 6 в табл. 15), представляют собой препараты, которые быстро агрегировались после инкубирования. Препараты, имеющие относительно низкие концентрации 1008 и высокие концентрации сахарозы (такие как препараты #3 и 5 в табл. 15), агрегировались более медленно, чем все остальные препараты. Исходя из данных, полученных в анализе на мутность различных препаратов, строили сигмоидальные кривые. Время инкубирования, соответствующее среднему времени фазового перехода, регистрировали как T_m (среднее время фазового перехода) для каждого препарата. Результаты представлены в табл. 15. Величины T_m для концентрации сахарозы и концентраций 1008 указывали на противоположное влияние концентраций сахарозы и 1008 на агрегацию белка.

После проведения испытаний с помощью анализа на мутность при 55°C, также проводили мониторинг на стабильность восьми отобранных препаратов при 40°C методами ВМП, ЭХ и ИОХ в течение 6 недель. Препараты и результаты анализа представлены в табл. 16-23. В анализе на мутность, результаты ВМП показали, что препараты с высокой концентрацией 1008 (~120 мг/мл) образовывали большее количество частиц, в частности, частиц размером более, чем 25 мкм по сравнению с препаратами, имеющими низкие концентрации API. Результаты ВМП не давали каких-либо явных эффектов концентрации сахарозы в препаратах с аналогичным количеством 1008 (препараты #7-10). Как показано на фиг. 4, после 6-недельного хранения при 40°C, два препарата (#2 и 4) с высокой концентрацией 1008 обнаруживали высокую степень разложения, а препараты с ~60 мг/мл 1008 обнаруживали меньшую степень разложения, чем все другие препараты. Как и в случае препаратов с ~90 мг/мл 1008, несколько меньшая степень разложения наблюдалась при более высокой концентрации сахарозы (препарат #8), чем при более низкой концентрации сахарозы (препарат #7). Результаты ИОХ показали такую же тенденцию, как и ЭХ.

Таблица 16. Результаты анализа на повышение стабильности при 40°C для препарата #1 в испытании 4

Условия получения препарата	F1: 61,6 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата, 6% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	42	18	107	26
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	6	2	4	4
≥50 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	1076	656	12911	2076
ЭХ (% от базовой величины)	99,9	93,6	83,0	77,1
ИОХ (% от базовой величины)	97,7	92,8	83,2	76,8

Таблица 17. Результаты анализа на повышение стабильности
при 40°C для препарата #2 в испытании 4

Условия получения препарата	F2: 122,8 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата, 6% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	36	8	16	32
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	8	2	2	2
≥50 мкм, <100 мкм (#/мл)	2	2	0	0
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	1267	994	235	4856
ЭХ (% от базовой величины)	100,0	91,2	78,7	63,3
ИОХ (% от базовой величины)	97,8	91,0	79,1	69,3

Таблица 18. Результаты анализа на повышение стабильности
при 40°C для препарата #3 в испытании 4

Условия получения препарата	F3: 60,0 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата, 9% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	10	22	16	28
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	2
≥50 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	959	782	897	2428
ЭХ (% от базовой величины)	100,0	94,0	84,8	77,7
ИОХ (% от базовой величины)	97,8	93,1	84,4	76,9

Таблица 19. Результаты анализа на повышение стабильности
при 40°C для препарата #4 в испытании 4

Условия получения препарата	F4: 119,0 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата, 9% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	12	24	4	16
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	4
≥50 мкм, <100 мкм	0	0	0	2

(#/мл)				
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	366	581	384	2659
ЭХ (% от базовой величины)	100,0	92,5	79,1	63,6
ИОХ (% от базовой величины)	97,8	92,2	81,3	69,1

Таблица 20. Результаты анализа на повышение стабильности
при 40°C для препарата #7 в испытании 4

Условия получения препарата	<u>F7</u> : 94,6 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата, 5,4% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	14	20	6	6
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥50 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	626	1647	843	2896
ЭХ (% от базовой величины)	100,0	93,1	82,2	70,3
ИОХ (% от базовой величины)	97,9	92,5	82,6	71,5

Таблица 21. Результаты анализа на повышение стабильности
при 40°C для препарата #8 в испытании 4

Условия получения препарата	<u>F8</u> : 86,2 мг/мл 1008 in 15 мМ цитрата, 9,6% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	4	18	8	8
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥50 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	533	1810	1281	2162
ЭХ (% от базовой величины)	100,0	93,3	83,2	73,8
ИОХ (% от базовой величины)	97,8	93,1	83,6	73,9

Таблица 22. Результаты анализа на повышение стабильности при 40°C для препарата #9 в испытании 4

Условия получения препарата	F9: 91,7 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата, 7,5% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	6	20	6	28
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	2	0
≥50 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	678	682	1068	4003
ЭХ (% от базовой величины)	100,0	93,8	83,0	71,0
ИОХ (% от базовой величины)	97,8	93,2	83,7	72,2

Таблица 23. Результаты анализа на повышение стабильности при 40°C для препарата #10 в испытании 4

Условия получения препарата	F10: 89,5 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата, 7,5% сахарозы, 0,05% PS80, pH 6,5			
Время	В начале испытания	2 недели	4 недели	6 недель
Частицы по ВМП				
≥10 мкм, <100 мкм (#/мл)	18	10	22	44
≥25 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	2	4	0
≥50 мкм, <100 мкм (#/мл)	0	0	0	0
≥2 мкм, <100 мкм (#/мл)	352	638	1068	2536
ЭХ (% от базовой величины)	100,0	93,9	83,4	72,0
ИОХ (% от базовой величины)	97,9	93,5	83,7	72,9

Пример 3.

Экспериментальные испытания на стабильность.

Контрольный препарат.

Экспериментальные испытания на стабильность осуществляли для препарата, представляющего собой раствор 60 мг/мл 1008 в 20 мМ цитрата, 0,001% PS20, pH 6,25, и используемого в качестве контроля. Контрольный препарат фильтровали через шприцевой 0,2 мкм-фильтр и хранили при 40°C, при комнатной температуре и в холодильнике. Образцы, хранившиеся при 40°C, брали через 0, 2 и 5 недель, а образцы, хранившиеся при комнатной температуре и в холодильнике, брали через 26 недель. Образцы, отобранные по их стабильности, тестировали на pH, осмомоляльность, состав по A280, ЭХ, ИОХ, КГЭ и ELISA. Результаты представлены в табл. 24.

**Таблица 24. Результаты экспериментального испытания
на стабильность контрольного препарата (60 мг/мл 1008 в 20 мМ
цитрата, 0,001% PS20 при pH 6,25)**

Температура		40°C		КТ	2-8°C
Время (недели)	0	2	5	26	26
Концентрация по	н.а.	62	61*	н.а.	н.а.
A280 (мг/мл)					
pH	н.а.	6,297	6,333	н.а.	н.а.
Осмоляльность	н.а.	312	310	н.а.	н.а.
ЭХ (% от базовой величины)	100	90,6	75,6	88,8	99,4
ИОХ (% от базовой величины)	100	91,3	70,9	88,5	99,3
КТЭ	н.а.	99,3	98,3	н.а.	н.а.
ELISA	н.а.	н.а.	1,0	н.а.	н.а.

* образец визуально наблюдался в виде мутного белого осадка.

Другое испытание осуществляли для контрольного препарата, содержащего раствор 60 мг/мл 1008 в 20 мМ цитрата, 0,001% PS20 и 0,73% NaCl при pH 6,25. Препарат фильтровали через шприцевой 0,2 мкм-фильтр и хранили при 40°C. Образцы брали через 1, 2, 3 и 4 недели для анализа, проводимого методом ВМП. Результаты представлены в табл. 25.

**Таблица 25. Результаты испытания на стабильность препарата РОС
при 40°C (60 мг/мл 1008 в 20 мМ цитрата, 0,001% PS20 при pH 6,25)**

Время (недели)	0	1	2	3	4
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	н.а.	172	894	2946	3183
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	н.а.	23	157	539	1189
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	н.а.	4	19	92	248
Все частицы по ВМП (#/мл)	н.а.	2381	8954	29716	17705

Экспериментальные испытания на стабильность препарата, содержащего 60 мг/мл 1008, 9% сахарозы и 0,5% полисорбата 80.

Экспериментальное испытание на стабильность осуществляли для препарата, содержащего раствор 60 мг/мл 1008, 9% сахарозы и 0,5% PS80. Препарат фильтровали через шприцевой 0,2 мкм-фильтр и хранили при 40°C. Образцы брали через 1,6, 2,9 и 4 недели для анализа методом ВМП, ЭХ и ИОХ. Результаты представлены в табл. 26.

**Таблица 26. Результаты испытания на стабильность препарата,
содержащего 60 мг/мл 1008 при 40°C (60 мг/мл 1008 в 20 мМ цитрата,
9% сахарозы и 0,5% PS80 при pH 6,25)**

Время (недели)	0	1,6	2,9	4
≥ 10 мкм по ВМП (#/мл)	–	12	80	130
≥ 25 мкм по ВМП (#/мл)	–	4	12	12
≥ 50 мкм по ВМП (#/мл)	–	0	4	0
Все частицы по ВМП (#/мл)	–	688	2900	4876
ЭХ (% от базовой величины)	98,4	93,3	88,6	84,1
ИОХ (% от базовой величины)	97,0	91,3	83,9	78,9

Пилотное испытание для 60 мг/мл 1008, 9% сахарозы, 20 мМ цитрата, 0,1% PS80 при pH 6,25

Испытание в реальном времени на стабильность раствора 60 мг/мл 1008 осуществляли для препарата, содержащего 9% сахарозы, 20 мМ цитрата, 0,1% PS80 при pH 6,25 как показано в табл. 27. Образцы, оцениваемые на стабильность, хранили при 2-8°C, 25°C,

40°C и в камере искусственного освещения (LC); а затем их подвергали трем циклам замораживания-оттаивания (FT). Образцы брали в соответствии со схемой испытаний, представленной в табл. 28, и анализировали различными аналитическими методами, такими как анализ на pH, осмоляльность и состав, и методами ВМП, ЭХ, ИОХ, КТЭ и анализ на активность.

**Таблица 27. Состав препарата, оцениваемого
в пилотном испытании на стабильность**

Компонент	Концентрация (масс./об. %)
1008	6
Лимонная кислота, безводная	0,012
Тринатрийцитрат (дигидрат)	0,57
Сахароза	9
Солисорбат 80	0,1
Соляная кислота или гидроксид натрия	pH 6,25
Вода для инъекций	дост. кол. до 100

**Таблица 28. Условия хранения и схема взятия образцов
для пилотного испытания на стабильность**

Условия	Взятие образцов
2-8°C (холодильник)	0; 4; 6,9; 8; 12 и 26 недель
25°C	2; 4; 6,9; 8; 12 и 26 недель
40°C	1,1; 2 и 4 недели
Камера искусственного освещения (LC)	6 недель
Замораживание-оттаивание (FT)	3 цикла

На ранней стадии испытания в реальном времени проводили анализ на стабильность раствора 60 мг/мл 1008. Данный препарат содержал 9% сахарозы, 20 мМ цитрата, 0,1% PS80 при pH 6,25 как показано в табл. 29. Образцы хранили при 2-8°C, 25°C, 40°C и в камере искусственного освещения (LC); а затем их подвергали трем циклам замораживания-оттаивания (FT). Образцы брали в соответствии со схемой испытаний, представленной в табл. 30, и анализировали различными аналитическими методами. Результаты анализа на стабильность представлены в табл. 31-33.

**Таблица 29. Состав препарата, оцениваемого в пилотном испытании на
стабильность и содержащего раствор 60 мг/мл 1008 (1008)**

Компонент	Концентрация (масс./об. %)
1008	6
Лимонная кислота, безводная	0,012
Тринатрийцитрат (дигидрат)	0,57
Сахароза	9
Солисорбат 80	0,1
Соляная кислота или гидроксид натрия	pH 6,25
Вода для инъекций	Дост. кол. до 100

**Таблица 30. Условия хранения и схема взятия образцов
для пилотного испытания на стабильность**

Условия	Взятие образцов
2-8°C (холодильник)	0; 4; 6,9; 8; 12 и 26 недель
25°C	2; 4; 6,9; 8; 12 и 26 недель
40°C	1,1; 2 и 4 недели
Камера искусственного освещения (LC)	6 недель
Замораживание-оттаивание (FT)	3 цикла

Таблица 31. Результаты (часть 1/3) пилотного испытания на стабильность для 6% 1008, 9% сахарозы, 20 мМ цитрата, 0,1% PS80 при pH 6,25

Температура	2-8°C					
Время (недели)	0	4	6, 9	8	12	26
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	31	57	134	8	19	42
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	8	4	31	4	0	11
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	0	0	8	0	0	4
Все частицы по ВМП (#/мл)	1284	4620	6848	5916	1047	4976
Внешний вид						
Концентрация (мг/мл)	58	64	66			
pH	6,197	6,184	6,184			
Осмоляльность	349	349	356			
УФ 280 (мг/мл)						
ЭХ (% от базовой величины)	100			99,5	99,4	99,9
ИОХ (% от базовой величины)	100			99,3	99,3	98,9
КГЭ	99,83			99,7	99,5	
ELISA	0,86			1,2	0,97	1,1

Таблица 32. Результаты (часть 2/3) пилотного испытания на стабильность для 6% 1008, 9% сахарозы, 20 мМ цитрата, 0,1% PS80 при pH 6,25

Температура	25°C					
Время (недели)	2	4	6, 9	8	12	26
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	46	50	206	27	38	157
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	4	4	50	4	0	19
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	0	0	11	0	0	0
Все частицы по ВМП (#/мл)	8186	6581	8679	2553	4143	10681
Внешний вид						
Концентрация (мг/мл)	66	75	69			
pH	6,209	6,198	6,196			
Осмоляльность	356	353	350			
УФ 280 (мг/мл)						
ЭХ (% от базовой величины)	99,3	98,1	95,8	95,2	93,8	86,6
ИОХ (% от базовой величины)	99,8	97,2	95,0	94,2	91,5	85,7
КГЭ	99,6	99,7		99,6	99,3	
ELISA	-	-	-	1,1	0,92	1,1

Таблица 33. Результаты (часть 3/3) пилотного испытания на стабильность для 6% 1008, 9% сахарозы, 20 мМ цитрата, 0,1% PS80 при pH 6,25

Температура	40°C				LC	FT
Время (недели)	0	1, 1	2	4	6	3 цикла
	31	34	161	88	287	138
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	8	4	50	15	31	19
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	0	0	15	4	0	0
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	1284	3871	6306	29372	16081	8415
Все частицы по ВМП (#/мл)				Наблюдался мутный белый осадок	желтый	
Внешний вид	58	66	65	74	57	63
Концентрация (мг/мл)	6,20	6,18	6,22	6,24	6,16	6,19
pH	349	348	350	353	353	349
Осмомоляльность (мОсм/кг)						
УФ 280 (мг/мл)	100	95,6	88,6	72,9	10,5	100
ЭХ (% от базовой величины)	100	98,1	89,1	71,3	n/a	100
ИОХ (% от базовой величины)	99,8	99,8	99,0	98,6	34,9	99,5
КТЭ	0,86	–	–	0,87		

Экспериментальный анализ на стабильность в цитратном буфере: 60 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата/6,75% сахарозы/0,05% PS80/pH 6,75

Экспериментальное испытание на стабильность в цитратном буфере осуществляли для препарата 60 мг/мл 1008, содержащего 15 мМ цитрата/6,75% сахарозы/0,05% PS80/pH 6,75. Образцы, оцениваемые на стабильность, хранили при 5 и 25°C, а также подвергали циклам замораживания-оттаивания. Образцы брали в соответствии со схемой испытаний, представленной в нижеследующей таблице, и оценивали на внешний вид, pH, осмомоляльность и состав методами ВМП, ЭХ и ИОХ.

Таблица 34. Условия хранения и схема взятия образцов для промежуточного испытания на стабильность

Условия	Взятие образцов
25°C	0, 1, 3, 6 и 9 месяцев
5°C	3, 6 и 9 месяцев
Замораживание-оттаивание (FT)	3 цикла

Аналогичным образом, экспериментальное испытание на стабильность в гистидиновом буфере осуществляли для препарата 60 мг/мл 1008, содержащего 15 мМ гистидина/6,75% сахарозы/0,05% PS80/pH 6,75. Образцы, оцениваемые на стабильность, хранили при 5 и 25°C. Эти образцы также подвергали циклам замораживания-оттаивания. Образцы брали в соответствии со схемой испытаний, представленной в нижеследующей таблице, и оценивали на внешний вид, pH, осмомоляльность и состав методами ВМП, ЭХ и ИОХ.

Таблица 35. Условия хранения и схема взятия образцов для промежуточного испытания на стабильность

Условия	Взятие образцов
25°C	0, 1, 3 и 6 месяцев
5°C	3 и 6 месяцев
Замораживание-оттаивание (FT)	3 цикла

Экспериментальные данные представлены в нижеследующей таблице.

Таблица 36. Результаты (часть 1/2) промежуточного испытания на стабильность при 25°C для 60 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата/6,75% сахарозы/0,05% PS80/pH 6,75

Время (месяцы)	В начале	1	3	6	9
	испытаний				
Частицы					
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	28	42	49	70	
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	3	0	3	3	
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	0	0	0	0	
Все частицы по ВМП (#/мл)	400	1819	2279	8355	
≥10 мкм по НІАС (#/мл)	218,3				
≥25 мкм по НІАС (#/мл)	38,7				
≥50 мкм по НІАС (#/мл)	7,0				
Все частицы по НІАС (#/мл)	11170				
Внешний вид					
Цвет	бесцветный	бесцветный	бесцветный	бесцветный	
Чистота	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	
pH	6,74	6,72	6,76		
Осмоляльность (мОсм)	320				
ЭХ (% от базовой величины)	99,9 (% площади)	98,6	94,2	97,4	
ИОХ (% от базовой величины)	97,0 (% площади)	98,4	94,2	91,0	89,9

Таблица 37. Результаты (часть 2/2) промежуточного испытания на стабильность для 60 мг/мл 1008 в 15 мМ цитрата/6,75% сахарозы/0,05% PS80/pH 6,75

Условия	5°C			Замораживание-оттаивание
Время (месяцы)	3	6	9	3 цикла
Частицы				
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	56	63		24
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	14	6,95		3
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	0	0		0
Все частицы по ВМП (#/мл)	1092	6322		29052
≥10 мкм по НІАС (#/мл)				441
≥25 мкм по НІАС (#/мл)				67
≥50 мкм по НІАС (#/мл)				18
Все частицы по НІАС (#/мл)				27700
Внешний вид				
Цвет	бесцветный	бесцветный		Не определяли
Чистота	NMT EP1	NMT EP1		Не определяли
pH	6,72	–		6,71
Осмоляльность (мОсм)	–	–		306
ЭХ (% от базовой величины)	99,8	99,8		99,7
ИОХ (% от базовой величины)	100,0	99,4	99,9	99,5

Таблица 38. Результаты (часть 1/2) промежуточного испытания на стабильность при 25°C для 60 мг/мл 1008 в 15 мМ гистидина/6,75% сахарозы/0,05% PS80/pH 6,75

Время (месяцы)	В начале испытаний	1	3	6
Частицы				
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	14	642	153	56
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	3	54	14	3
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	0	4	0	0
Все частицы по ВМП (#/мл)	302	20483	9805	13374
≥10 мкм по НИАС (#/мл)	1493			
≥25 мкм по НИАС (#/мл)	127			
≥50 мкм по НИАС (#/мл)	15			
Все частицы по НИАС (#/мл)	17341			
Внешний вид				
Цвет	бесцветный	бесцветный	бесцветный	бесцветный
Чистота	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1
pH	6,72	6,70	6,70	
Осмоляльность (мОсм)	286			
ЭХ (% от базовой величины)	99,9 (% площади)	98,3	93,6	97,5
ИОХ (% от базовой величины)	97,1 (% площади)	97,9	92,5	87,8

Таблица 39. Результаты (часть 2/2) промежуточного испытания на стабильность 60 мг/мл 1008 в 15 мМ гистидина/6,75% сахарозы/0,05% PS80/pH 6,75

Условия	5°C		Замораживание-оттаивание
Время (месяц)	3	6	3 цикла
Частицы			
≥10 мкм по ВМП (#/мл)	167	59,	17
≥25 мкм по ВМП (#/мл)	10	7	0
≥50 мкм по ВМП (#/мл)	3	0	0
Все частицы по ВМП (#/мл)	17404	7368	7607
≥ 10 мкм по НИАС (#/мл)			756
≥ 25 мкм по НИАС (#/мл)			175
≥ 50 мкм по НИАС (#/мл)			51
Все частицы по НИАС (#/мл)			27698
Внешний вид			
Цвет	Бесцветный	Бесцветный	ND
Прозрачность	NMT EP1	NMT EP1	ND
pH	6,70		6,70
Осмоляльность (mOsm)	–	–	271
ЭХ (% от базовой величины)	99,7	100,0	99,9
ИОХ (% от базовой величины)	99,2	99,2	99,2

Экспериментальные данные показали, что стабильность тестируемых препаратов значительно повышалась, а в частности, в результате ингибирования образования крупных частиц по сравнению со стабильностью контрольного препарата при концентрации белка 60 мг/мл.

Было установлено, что стабильный препарат в виде раствора содержал 15 мМ цитрата/6,75% сахарозы/0,0505% PS80, как показано в табл. 40.

Таблица 40

Компонент	Концентрация (масс./об. %)	Интервалы концентраций (масс./об. %)
1008	12	6-12
Лимонная кислота, безводная	0,009	0,006-0,012
Тринатрийцитрат (дигидрат)	0,428	0,285-0,57
Сахароза	6,75	6,75
Солисорбат 80	0,05%	0,05%
Соляная кислота или гидроксид натрия	pH 6,75	pH 6,75
Вода для инъекций	Дост. кол. до 100	Дост. кол. до 100

В настоящей заявке подробно описано настоящее изобретение и варианты его осуществления. Однако, объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами, относящимися к любым способам, изделиям, составу препарата, соединениям, средствам, методам и/или стадиям, описанным в настоящей заявке. В настоящее изобретение могут быть внесены различные модификации, замены и варианты, не выходящие за рамки существа и/или основного объема настоящего изобретения. В соответствии с этим, исходя из описания изобретения, специалисту в данной области будет очевидно, что внесенные модификации, замены и/или варианты, обеспечивающие, по существу, те же самые функции или дающие, по существу, тот же результат, как и описанные здесь варианты, могут быть применены в соответствии с такими родственными вариантами согласно изобретению. Таким образом, нижеследующая формула изобретения охватывает модификации, замены и варианты согласно изобретению, относящиеся к любым способам, изделиям, составу препарата, соединениям, средствам, методам и/или стадиям, описанным в настоящей заявке. Формула изобретения не должна рассматриваться как ограничение порядка следования ее пунктов или элементов, если это не является необходимым для конкретных целей. При этом следует отметить, что в настоящее изобретение могут быть внесены различные изменения формы и деталей описания изобретения, не выходящие за рамки объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водная фармацевтическая композиция для лечения глазного заболевания опосредуемого VEGF, включающая 120 мг/мл анти-VEGF антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, от 0,006 до 0,012% лимонной кислоты (мас./об.), от 0,2 до 0,6% дигидрата тринатрийцитрата (мас./об.) и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

2. Водная фармацевтическая композиция для лечения глазного заболевания опосредуемого VEGF, включающая 120 мг/мл анти-VEGF антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, 10-20 мМ цитратного буфера и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

3. Водная фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где глазное заболевание представляет собой глазное неоваскулярное заболевание.

4. Водная фармацевтическая композиция по п.3, где глазное неоваскулярное заболевание выбрано из группы, состоящей из аномального ангиогенеза, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), нарушения сосудистой проницаемости сетчатки, отека сетчатки, диабетической ретинопатии (в частности, пролиферативной диабетической ретинопатии), диабетического отека желтого пятна, неоваскулярной (экссудативной) возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), включая CNV, связанной с pAMD (неоваскулярная AMD), осложнения, связанные с ишемией сетчатки, закупорки центральной вены сетчатки (CRVO) и неоваскуляризацией заднего сегмента сетчатки.

5. Водная фармацевтическая композиция для лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), содержащая 120 мг/мл анти-VEGF антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, от 0,006 до 0,012% лимонной кислоты (мас./об.), от 0,2 до 0,6% дигидрата тринатрийцитрата (мас./об.) и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

6. Водная фармацевтическая композиция для лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), содержащая 120 мг/мл анти-VEGF антитела, которое содержит последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, 10-20 мМ цитратного буфера и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

7. Водная фармацевтическая композиция для лечения диабетического отека желтого пятна, содержащая 120 мг/мл анти-VEGF антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2,

от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, от 0,006 до 0,012% лимонной кислоты (мас./об.), от 0,2 до 0,6% дигидрата тринатрийцитрата (мас./об.) и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

8. Водная фармацевтическая композиция для лечения диабетического отека желтого пятна, содержащая 120 мг/мл анти-VEGF антитела, которое содержит последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, 10-20 мМ цитратного буфера и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

9. Водная фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, где pH композиции составляет 6,8.

10. Водная фармацевтическая композиция по любому из пп.1-9, где антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

11. Водная фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, где концентрация анти-VEGF антитела составляет 120 мг/мл, концентрация сахарозы составляет 6,8% (мас./об.), концентрация лимонной кислоты составляет 0,01% (мас./об.), концентрация дигидрата тринатрийцитрата составляет 0,428% (мас./об.), а концентрация полисорбата 80 составляет 0,05% (мас./об.).

12. Водная фармацевтическая композиция по п.11, где анти-VEGF антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, а pH составляет 6,8.

13. Предварительно заполненный шприц для доставки анти-VEGF антитела субъекту, содержащий водную фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10.

14. Предварительно заполненный шприц для доставки анти-VEGF антитела субъекту, содержащий водную фармацевтическую композицию по п.11 или 12.

15. Водная фармацевтическая композиция для лечения глазного заболевания опосредуемого VEGF, включающая 60 мг/мл анти-VEGF антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, от 0,006 до 0,012% лимонной кислоты (мас./об.), от 0,2 до 0,6% дигидрата тринатрийцитрата (мас./об.) и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

16. Водная фармацевтическая композиция для лечения глазного заболевания опосредуемого VEGF, включающая 60 мг/мл анти-VEGF антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, от 4,5 до 11% (мас./об.) сахарозы или от 5 до 10% (мас./об.) трегалозы, 10-20 мМ цитратного буфера и от 0,01 до 0,1% полисорбата 80 (мас./об.), где pH композиции составляет от 6,3 до 7,3.

17. Водная фармацевтическая композиция по п.15 или 16, где глазное заболевание представляет собой глазное неоваскулярное заболевание.

18. Водная фармацевтическая композиция по п.17, где глазное неоваскулярное заболевание выбрано из группы, состоящей из аномального ангиогенеза, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), нарушения сосудистой проницаемости сетчатки, отека сетчатки, диабетической ретинопатии (в частности, пролиферативной диабетической ретинопатии), диабетического отека желтого пятна, неоваскулярной (экссудативной) возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), включая CNV, связанной с pAMD (неоваскулярная AMD), осложнения, связанные с ишемией сетчатки, закупорки центральной вены сетчатки (CRVO) и неоваскуляризацией заднего сегмента сетчатки.

19. Водная фармацевтическая композиция по любому из пп.15-18, где pH композиции составляет 6,8.

20. Водная фармацевтическая композиция по любому из пп.15-19, где антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

21. Водная фармацевтическая композиция по любому из пп.15-20, где концентрация анти-VEGF антитела составляет 60 мг/мл, концентрация сахарозы составляет 6,75% (мас./об.), концентрация лимонной кислоты составляет 0,01% (мас./об.), концентрация дигидрата тринатрийцитрата составляет 0,428% (мас./об.), а концентрация полисорбата 80 составляет 0,05% (мас./об.).

22. Водная фармацевтическая композиция по п.21, где анти-VEGF антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 и pH составляет 6,8.

23. Предварительно заполненный шприц для доставки анти-VEGF антитела субъекту, содержащий водную фармацевтическую композицию по любому из пп.15-20.

24. Предварительно заполненный шприц для доставки анти-VEGF антитела субъекту, содержащий водную фармацевтическую композицию по п.21 или 22.

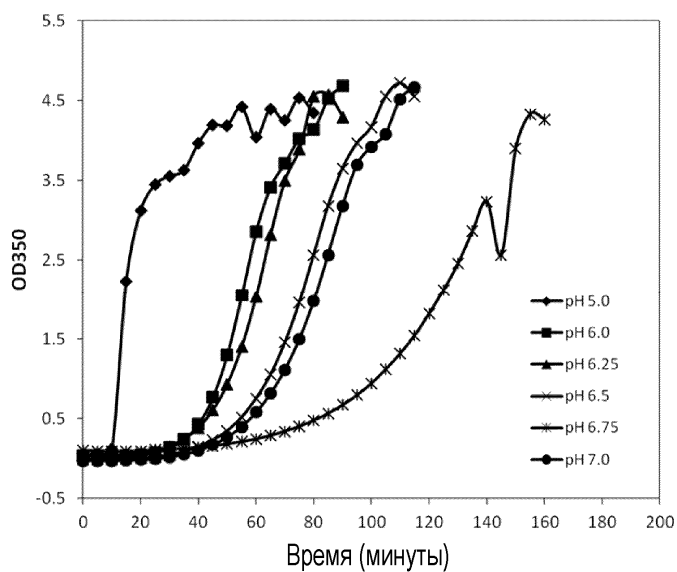
25. Способ доставки анти-VEGF антитела индивидууму, включающий стадию введения индивидууму водной фармацевтической композиции по любому из пп.1-12, 15-22.

26. Способ лечения глазного заболевания опосредуемого VEGF, где указанный способ включает введение индивидууму водной фармацевтической композиции по любому из пп.1-12, 15-22.

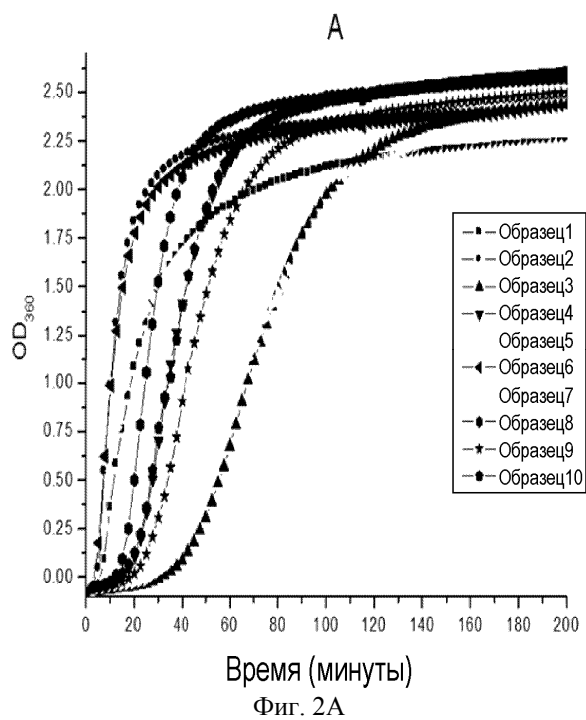
27. Способ по п.26, где указанное глазное заболевание представляет собой глазное неоваскулярное заболевание.

28. Способ по п.27, где указанное глазное неоваскулярное заболевание выбрано из группы, состоящей из аномального ангиогенеза, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), нарушения сосудистой проницаемости сетчатки, отека сетчатки, диабетической ретинопатии (в частности, пролиферативной диабетической ретинопатии), диабетического отека желтого пятна, неоваскулярной (экссудативной) возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), включая CNV, связанной с pAMD (неоваскулярная AMD), осложнения, связанные с ишемией сетчатки, закупорки центральной вены сетчатки (CRVO) и неоваскуляризацией заднего сегмента сетчатки.

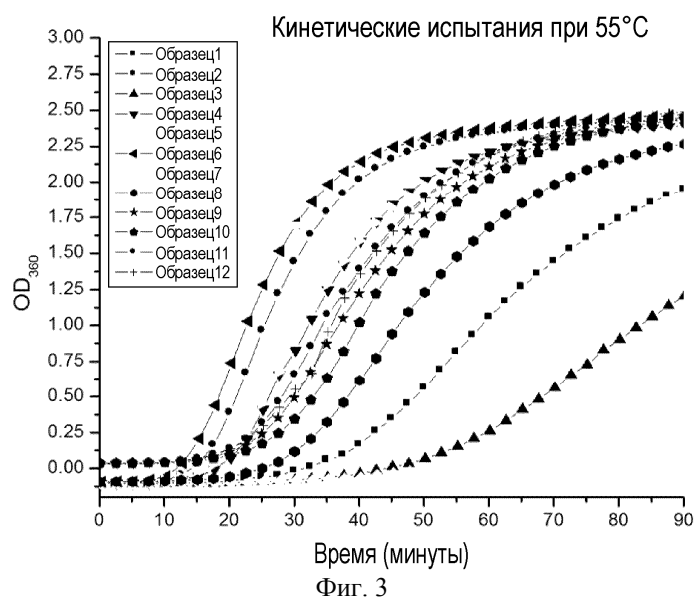
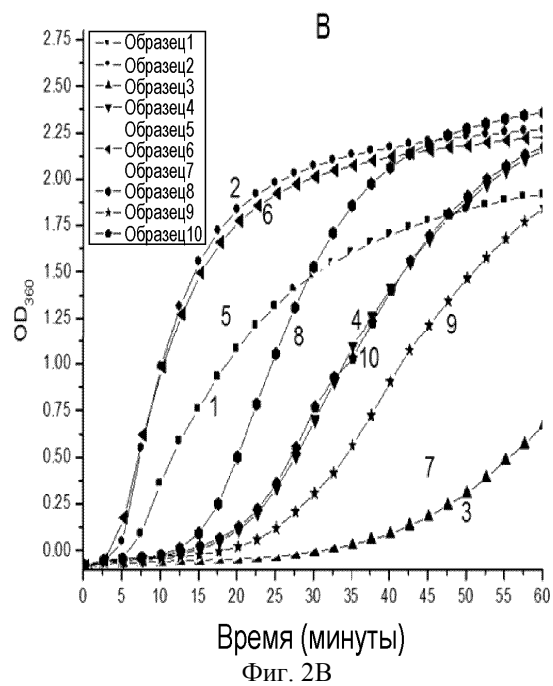
тной дегенерации желтого пятна (AMD), включая CNV, ассоциированную с pAMD (неоваскулярная AMD), осложнения, ассоциированные с ишемией сетчатки, закупорки центральной вены сетчатки (CRVO) и неоваскуляризации заднего сегмента сетчатки.

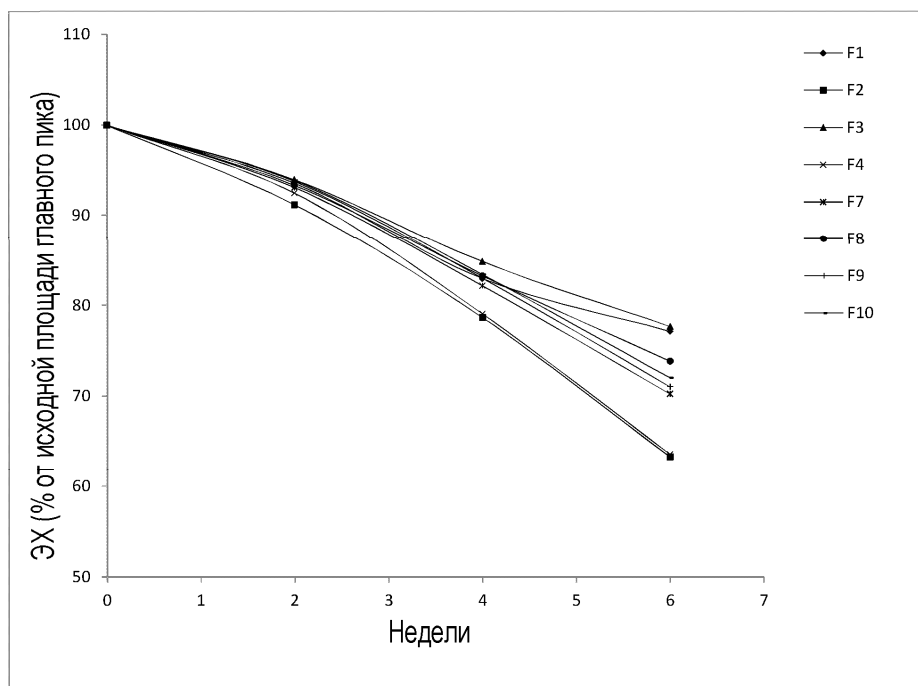


Фиг. 1



Фиг. 2А





Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2