

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043092

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.25

(21) Номер заявки
201891339

(22) Дата подачи заявки
2016.12.05

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ВОДНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ, КОТОРЫЙ СОДЕРЖИТ АНТИТЕЛО К PD-L1 АВЕЛУМАБ

(31) 15198233.7

(32) 2015.12.07

(33) EP

(43) 2019.01.31

(86) PCT/EP2016/002040

(87) WO 2017/097407 2017.06.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE);
ПФАЙЗЕР, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ринальди Джанлука, Дель Рио
Алессандра, Фратарканджели
Сильвия (IT), Вайгандт Маркус, Фосс
Зента (DE)

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

(56) WO-A1-2013079174
WO-A1-2015048520
WO-A1-2012135408
WO-A1-2015057910

(57) Изобретение относится к вариантам новых водных фармацевтических препаратов, которые содержат антитело к PD-L1 авелумаб и фармацевтически приемлемые добавки, но не содержат антиоксидант, а также к способу лечения злокачественного новообразования, включающему введение указанного препарата.

B1

043092

043092

B1

Настоящее изобретение относится к новому препарату антитела к PD-L1. В особенности изобретение относится к водному фармацевтическому препарату антитела к PD-L1 авелумабу.

Предпосылки создания изобретения

Рецептор запрограммированной гибели 1 (PD-1) и PD-1 лиганды 1 и 2 (PD-L1, PD-L2) занимают центральное место в иммунной регуляции. Экспрессируемый на активированных Т-клетках PD-1 активируется посредством PD-L1 и PD-L2, экспрессируемыми стромальными клетками, опухолевыми клетками или обоими видами клеток, инициируя клеточную гибель и локализованную иммунную супрессию (Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7

family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5:1365-69; Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, и др. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192:1027-34; Dong H, Strome SE, Salomao DR, и др. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8:793-800. [Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039; Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24:207-12),

потенциально обеспечивая иммунотолерантную среду для развития и роста опухоли. Но в то же время ингибирование этого взаимодействия может усиливать локальные ответные реакции Т-клеток и опосредуют противоопухолевую активность на доклинических моделях животных (Dong H, Strome SE, Salomao DR, и др. *Nat Med* 2002; 8:793-800.

[Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039; Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, и др. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12293-97).

В клинических условиях было описано, что лечение с помощью антител, которые блокируют взаимодействие PD-1 - PD-L1, продуцирует частоту объективных ответов 7 до 38% у пациентов с поздними стадиями или метастатическими солидными опухолями с приемлемыми профилями безопасности (Hamid O, Robert C, Daud A, и др. Safety and tumor responses with lambrolizumab

(Anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134-44; Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, и др.

Safety and activity of antibody to PD-L1 in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455-65; Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, и др. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-54; Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, и др. Predictive correlates of response to the antibody to PD-L1 MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-67).

Примечательно, что ответы проявляются пролонгированными с продолжительностью 1 год или больше для большинства пациентов.

Авелумаб (известен как MSB0010718C) представляет собой полноразмерное моноклональное антитело для изотипа иммуноглобулина (Ig) G1. Авелумаб селективно связывается с PD-L1 и конкурентно блокирует его взаимодействие с PD-1.

По сравнению с антителами к PD-1, которые нацелены на Т-клетки, авелумаб нацелен на опухолевые клетки, и, следовательно, полагают, что они имеют меньше побочных эффектов, включая сниженный риск аутоиммунно опасных отклонений, связанных с аутоиммунными заболеваниями, так как блокада PD-L1 оставляет интактным путь PD-L2-PD-1, что способствует периферической аутоотолерантности (Latchman Y., Wood C.R., Chernova T. et al.. PD-L1 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation, *Nat. Immunol.*, 2001, 2(3):261-68).

Авелумаб в настоящее время тестируют в клинических условиях для различных типов злокачественных новообразований, включая немелкоклеточный рак легких, уротелиальную карциному, мезотелиому, карциному из клеток Меркеля, рак желудка или гастроэзофагеального перехода, рак яичников и рак молочной железы.

Аминокислотные последовательности авелумаба и варианты последовательностей и их антигенсвязывающие фрагменты описаны в WO 2013079174, где антитело, имеющее аминокислотную последовательность авелумаба, обозначается как A09-246-2. Также описаны способы приготовления и определенные медицинские применения.

Дальнейшие медицинские применения авелумаба описаны в WO 2016137985, PCT/IB2016/052748, PCT/US2016/037498, PCT/US2016/053939, заявке на US серийный № 62/341921.

В WO 2013079174 также описан в разделе 2.4 водный человеческий препарат антитела, имеющего аминокислотную последовательность авелумаба. Этот препарат содержит антитело в концентрации 10 мг/мл, метионин в качестве антиоксиданта и имеет pH 5,5.

Исследование препарата для негликозилированного антитела к PD-L1 типа IgG1 описано в WO 2015048520, где препарат с pH 5,8 выбран для клинических исследований.

Описание изобретения

Поскольку авелумаб обычно доставляется пациенту путем внутривенной инфузии и, следовательно, обеспечивается в водной форме, то настоящее изобретение относится к другим водным препаратам, которые пригодны для стабилизации авелумаба с его посттрансляционными модификациями и при более высоких концентрациях по сравнению с описанным в WO 2013079174.

На фиг. 1a (SEQ ID NO: 1) представлена полноразмерная последовательность тяжелой цепи авелумаба, как экспрессируется CHO клетками, используемыми в качестве организма-хозяина.

Тем не менее часто наблюдается, что во время продукции антитела С-концевой лизин (К) тяжелой цепи отщепляется. Расположенная в Fc участке, эта модификация не оказывает влияния на связывание антитела с антигеном. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления С-концевой лизин (К) последовательности тяжелой цепи авелумаба отсутствует. Последовательность тяжелой цепи авелумаба без С-концевого лизина представлена на фиг. 1b (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 2 (SEQ ID NO: 3) представлена полноразмерная последовательность легкой цепи авелумаба.

Посттрансляционная модификация с высокой значимостью представляет собой гликозилирование.

Большинство растворимых и мембраносвязанных белков, которые вырабатаны в эндоплазматическом ретикулуме эукариотических клеток, подвергаются гликозилированию, при котором ферменты, называемые гликозилтрансферазами, присоединяют одну или несколько сахарных единиц к специфическим сайтам гликозилирования белков. Наиболее часто точками присоединения являются NH₂ или OH группы, что приводит к N-связанному или O-связанному гликозилированию.

Это применяется также к белкам, таким как антитела, которые продуцируются рекомбинантно в эукариотических клетках-хозяевах. Рекомбинантные IgG антитела содержат консервативный N-связанный сайт гликозилирования на определенном аспарагиновом остатке Fc участка в CH2 домене. Существует много известных физиологических функций N-связанного гликозилирования в антителе, такие как воздействие на его растворимость и стабильность, резистентность к протеазе, связывание с Fc-рецепторами, клеточный транспорт и циркулирующий период полувыведения in vivo (Hamm M. et al., Pharmaceuticals 2013, 6, 393-406). N-гликановые структуры IgG антитела представляют собой главным образом структуры типа двухантенного комплекса, содержащие единицы b-D-N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), маннозы (Man) и часто галактозы (Gal) и фукозы (Fuc).

В авелумабе единственный сайт гликозилирования представляет собой Asn300, расположенный в CH2 домене обоих тяжелых цепей. Подробности гликозилирования описаны в примере 1.

Поскольку гликозилирование оказывает влияние на растворимость и стабильность антитела, является рациональным принимать этот параметр во внимание при разработке стабильного фармацевтически подходящего препарата антитела.

Неожиданно изобретателями настоящей патентной заявки было обнаружено, что представляется возможным стабилизировать авелумаб, полностью охарактеризованный его аминокислотной последовательностью и его посттрансляционными модификациями, в различных водных препаратах без присутствия антиоксиданта при максимально низких значениях pH, таких как 5,2.

Описание фигур

Фиг. 1a: последовательность тяжелой цепи авелумаба (SEQ ID NO: 1).

Фиг. 1b: последовательность тяжелой цепи авелумаба, в которой отсутствует С-концевой К (SEQ ID NO: 2).

Фиг. 2: последовательность легкой цепи авелумаба (SEQ ID NO: 3).

Фиг. 3: вторичная структура авелумаба.

Фиг. 4: 2AB HILIC-UPLC хроматограмма гликанов авелумаба.

Фиг. 5: нумерация пиков по фиг. 4.

Фиг. 6: суммарные агрегаты согласно эксклюзионной ВЭЖХ DoE2 препаратов (40°C).

Фиг. 7: суммарные агрегаты согласно эксклюзионной ВЭЖХ DoE2 препаратов (25°C).

Фиг. 8: фрагменты с помощью Bioanalyzer DoE2 препаратов (40°C).

Фиг. 9: фрагменты с помощью Bioanalyzer DoE2 препаратов (25°C).

Фиг. 10: распространенность кислого кластера и основного пика для DoE2 (25°C).

Фиг. 11: долгосрочная стабильность LMW (%) при 2-8°C.

Фиг. 12: долгосрочная стабильность частиц, невидимых невооруженным глазом ≥10 мкм при 2-8°C.

Фиг. 13: долгосрочная стабильность частиц, невидимых невооруженным глазом ≥25 мкм при 2-8°C.

Фиг. 14: долгосрочная стабильность кислого кластера (%) при 2-8°C.

- Фиг. 15: долгосрочная стабильность основного пика (%) при 2-8°C.
 Фиг. 16: долгосрочная стабильность щелочного кластера (%) при 2-8°C.
 Фиг. 17: долгосрочная стабильность LMW (%) при 25°C.
 Фиг. 18: долгосрочная стабильность частиц, невидимых невооруженным глазом ≥ 10 мкм при 25°C.
 Фиг. 19: долгосрочная стабильность частиц, невидимых невооруженным глазом ≥ 25 мкм при 25°C.
 Фиг. 20: долгосрочная стабильность кислого кластера (%) при 25°C.
 Фиг. 21: долгосрочная стабильность основного пика (%) при 25°C.
 Фиг. 22: долгосрочная стабильность щелочного кластера (%) при 25°C.
 Фиг. 23: долгосрочная стабильность LMW (%) при 40°C.
 Фиг. 24: долгосрочная стабильность частиц, невидимых невооруженным глазом ≥ 10 мкм при 40°C.
 Фиг. 25: долгосрочная стабильность частиц, невидимых невооруженным глазом ≥ 25 мкм при 40°C.
 Фиг. 26: долгосрочная стабильность кислого кластера (%) при 40°C.
 Фиг. 27: долгосрочная стабильность основного пика (%) при 40°C.
 Фиг. 28: долгосрочная стабильность щелочного кластера (%) при 40°C.

Полное описание изобретения

Определения.

Если специально не указано иначе, следующие термины, используемые в описании и пунктах формулы изобретения, имеют следующие значения, представленные ниже.

Ссылки в настоящей заявке на "авелумаб" включают антитело к PD-L1 типа IgG1, как определено в WO 2013079174 с помощью его аминокислотной последовательности и как определено в настоящей патентной заявке с помощью его аминокислотной последовательности и с помощью его посттрансляционных модификаций. Ссылки в настоящей заявке на "авелумаб" могут включать биоэквиваленты, которые, например, могут иметь общими по меньшей мере 75%, подходяще по меньшей мере 80%, подходяще по меньшей мере 85%, подходяще по меньшей мере 90%, подходяще по меньшей мере 95%, подходяще по меньшей мере 96%, подходяще по меньшей мере 97%, подходяще по меньшей мере 98% или наиболее подходяще по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности, идентичной с аминокислотными последовательностями, описанными в WO 2013079174. Альтернативно или дополнительно ссылки в настоящей заявке на "авелумаб" могут включать биоэквиваленты, которые отличаются по посттрансляционным модификациям, в особенности характеру гликозилирования, описанному в настоящей заявке.

Термин "биоаналог" также известен как биоподобные лекарственные препараты, хорошо известные в данной области техники, и квалифицированный специалист может легко определить, когда лекарственное средство будет рассматриваться как биоаналог авелумаба. Термин "биоаналог" обычно используется для описания последующих версий (обычно из другого источника) "изобретательские биофармацевтические продукты" ("биопрепараты", лекарственное вещество которых произведено живым организмом или имеет происхождение из живого организма или с помощью методик рекомбинантной ДНК или контролируемой экспрессии генов), которые ранее официально получили регистрационное удостоверение. Поскольку биопрепараты имеют высокую степень молекулярной сложности и в целом чувствительны к способам производства (например, если для их получения используются различные клеточные линии) и поскольку последующие производители "второго эшелона" в целом не имеют доступа ни к молекулярному клону разработчика, клеточному банку, ноу-хау относительно процесса ферментации и очистки, ни к самому активному компоненту лекарственного средства (только к серийно производимому разработчиками лекарственному продукту), любой "биоаналог" маловероятно будет таким же, как оригинальное лекарственное средство. В настоящей заявке термин "буфер" или "буферный раствор" относится к обычно к водному раствору, содержащему смесь кислоты (обычно слабой кислоты, например, уксусная кислота, лимонная кислота, имидазолиевая форма гистидина) и ее конъюгированного основания (например, ацетатной или цитратной соли, например ацетат натрия, цитрат натрия, или гистидин) или альтернативно смесь основания (обычно слабого основания, например гистидина) и его конъюгированной кислоты (например, протонированной соли гистидина). Значение pH "буферного раствора" будет изменяться только незначительно при добавлении небольшого количества сильного основания или кислоты благодаря "буферному эффекту", обеспечиваемому "буферным агентом".

В настоящей заявке "буферная система" содержит один или несколько буферный(ых) агент(ов) и/или его(их) конъюгат(ы) с кислотой или основанием, и более подходяще содержит один или несколько буферный(ых) агент(ов) и его(их) конъюгат(ов) с кислотой или основанием, и наиболее подходяще содержит только один буферный агент и его кислотный/щелочной конъюгат. Если специально не указано иначе, любые концентрации, указанные в настоящем изобретении по отношению к "буферной системе" (т.е. концентрация буфера), подходяще относятся к объединенной концентрации буферного(ых) агента(ов) и/или его конъюгата(ов) с кислотой или основанием. Другими словами, концентрации, указанные в настоящей заявке по отношению к "буферной системе", подходяще относятся к объединенной концентрации релевантных буферных видов (т.е. видов в динамическом равновесии друг с другом, например, цитрат/лимонная кислота). По существу данная концентрация гистидиновой буферной системы в целом относится к объединенной концентрации гистидина и имидазолиевой формы гистидина. Тем не менее в

случае гистидина такие концентрации обычно легко рассчитать путем ссылки на входные количества гистидина или его соли. Суммарное значение pH композиции, содержащей релевантную буферную систему, является отображением равновесной концентрации каждого из релевантных буферных видов (т.е. баланса буферного(ых) агента(ов) с его конъюгатом(ами) с кислотой или основанием).

В настоящей заявке термин "буферный агент" относится к кислотному или щелочному компоненту (обычно слабой кислоте или слабому основанию) буфера или буферного раствора. Буферный агент помогает поддерживать значение pH данного раствора при или около заранее определенного значения, и буферные агенты обычно выбирают для дополнения заранее определенного значения. Буферный агент подходяще представляет собой единственное соединение, которое приводит к желательному буферному эффекту, в особенности, если указанный буферный агент смешанный с (и подходяще способен к протонному обмену с) подходящим количеством (в зависимости от заранее определенного желательного значения) его соответствующего "кислотного/щелочного конъюгата" или если требуемое количество его соответствующего "кислотного/щелочного конъюгата" образуется *in situ*; это может достигаться путем добавления сильной кислоты или основания до достижения требуемого значения pH. Например, в буферной системе с ацетатом натрия представляется возможным начинать прежде всего с раствора ацетата натрия (щелочной), который затем подкисляют с помощью, например, соляной кислоты, или к раствору уксусной кислоты (кислотный) добавляют гидроксид натрия или ацетат натрия до достижения желательного значения pH.

В целом "стабилизатор" относится к компоненту, который облегчает поддержание структурной целостности биофармацевтического лекарственного средства в особенности во время замораживания, и/или лиофилизации, и/или хранения (в особенности когда подвергается стрессу). Этот стабилизирующий эффект может быть обусловлен различными причинами; полагают, типично такие стабилизаторы могут действовать в качестве осмолитов, которые подавляют денатурацию белка. Как используется в настоящей заявке, стабилизаторы представляют собой аминокислоты (т.е. свободные аминокислоты, не являющиеся частью пептида или белка, например глицин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота, лизин), и сахарные стабилизаторы, такие как сахарный полиспирт (например, маннит, сорбит) и/или дисахарид (например, трегалоза, сахароза, мальтоза, лактоза).

Агенты, используемые в качестве буферных агентов, антиоксидантов или поверхностно-активных веществ в соответствии с изобретением, исключены из значения термина "стабилизаторы", как используется в настоящей заявке, даже если они могут проявлять, в частности, стабилизирующую активность.

В настоящей заявке термин "поверхностно-активное вещество" относится к поверхностно-активному агенту, предпочтительно неионному поверхностно-активному веществу. Примеры поверхностно-активных веществ, используемых в настоящей заявке, включают полисорбат (например, полисорбат 20 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурат) также известен под торговой маркой твин 20); полоксамер (например, полоксамер 188, неионные триблочные сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилен (поли(пропилен оксида)), окруженной с обеих сторон двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилен (поли(этилен оксида))), также известные под торговой маркой Lutrol F 68).

В настоящей заявке термин "стабильный" в целом относится к физической стабильности и/или химической стабильности и/или биологической стабильности компонента, типично активного или его композиции, во время консервирования /хранения.

Агенты, используемые в качестве буферных агентов, антиоксидантов или стабилизаторов в соответствии с изобретением, исключены из значения термина "поверхностно-активные вещества", как используется в настоящей заявке, даже если они могут проявлять, в частности, поверхностно-активную активность.

В настоящей заявке термин "антиоксидант" относится к агенту, способному предотвращать или снижать окисление биофармацевтического лекарственного средства для стабилизации в препарате. Антиоксиданты включают поглотители свободных радикалов (например, аскорбиновую кислоту, ВНТ, сульфит натрия, *n*-амино бензойную кислоту, глутатион или пропил галлат), хелатирующие агенты (например, EDTA или лимонная кислота) или агенты, обрывающие цепи (например, метионин или *N*-ацетил цистеин).

Агенты, используемые в качестве буферных агентов, стабилизаторов или поверхностно-активных веществ в соответствии с изобретением, исключены из значения термина "антиоксиданты", как используется в настоящей заявке, даже если они могут проявлять, в частности, антиоксидантную активность.

"Разбавитель" представляет собой агент, который устанавливает баланс ингредиентов в любой жидкой фармацевтической композиции, например, таким образом, что проценты по весу всего равны 100%. В настоящей заявке жидкая фармацевтическая композиция представляет собой водную фармацевтическую композицию таким образом, что "разбавитель", как используется в настоящей заявке, представляет собой воду, предпочтительно воду для инъекций (WFI).

В настоящей заявке термин "размер частиц" или "размер пор" относится соответственно к длине наибольшего измерения данной частицы или поры. Оба размера могут быть измерены, используя лазерный анализатор размера частиц и/или электронные микроскопы (например, туннелирующий электронный микроскоп, ТЕМ, или сканирующий электронный микроскоп, SEM). Количество частиц (для любого

данного размера) может быть получено с использованием протоколов и оборудования, изложенных в примерах, что относится к количеству частиц для частиц, невидимых невооруженным глазом.

В настоящей заявке термин "приблизительно" относится к обычным границам погрешности для соответствующего значения, хорошо известным квалифицированному специалисту в данной области техники. Ссылка на "приблизительно" для значения или параметра в настоящей заявке включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся к значению или параметру per se. В случае сомнений или если в данной области техники отсутствует общепринятое понимание относительно границ погрешности для определенного значения или параметра, "приблизительно" обозначает $\pm 5\%$ этого значения или параметра.

В настоящей заявке термин "общий процент" для видов гликанов относится непосредственно к числу различных видов. Например, термин "указанный FA2G1 имеет общими 25-41% всех видов гликанов" обозначает, что в 50 анализируемых молекул антител, имеющих 100 тяжелых цепей, 25-41 тяжелых цепей будут проявлять FA2G1 характер гликозилирования.

Следует принять во внимание, что "лечить" или "лечение" включают профилактику, а также облегчение установленных симптомов состояния. "Лечить" или "лечение" синдрома, нарушения или состояния, следовательно, включает

(1) предотвращение или замедление появления клинических симптомов синдрома, нарушения или состояния, развивающегося у человека, который может страдать или быть предрасположен к синдрому, нарушению или состоянию, но еще не ощущает или не проявляются клинические или субклинические симптомы синдрома, нарушения или состояния;

(2) ингибирование синдрома, нарушения или состояния, т.е. остановка, уменьшение или замедление развития заболевания или его рецидива (в случае поддерживающей терапии) или по меньшей мере его одного клинического или субклинического симптома; или

(3) облегчение или ослабление заболевания, т.е. вызывание регресса синдрома, нарушения или состояния или по меньшей мере одного из его клинических или субклинических симптомов.

Водный препарат антитела к PD-L1.

В первом аспекте изобретение обеспечивает новый водный фармацевтический препарат антитела, который содержит

(I) авелумаб в концентрации от 1 до 30 мг/мл в качестве антитела;

(II) ацетат или гистидин в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента;

(III) D-маннит или трегалозу в концентрации от 240 до 320 мМ либо комбинацию аргинина HCl в концентрации от 50 до 150 мМ и глутаминовой кислоты в концентрации от 25 до 75 мМ в качестве стабилизатора;

(IV) полоксамер 188 или полисорбат 20 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества (или не содержит поверхностно-активного вещества),

где препарат не содержит метионин и дополнительно имеет pH от 5,0 до 6,0, предпочтительно от 5,0 до 5,6.

В предпочтительном варианте осуществления препарат не содержит какого-либо антиоксиданта.

В варианте осуществления изобретения концентрация авелумаба в указанном препарате составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл.

В другом варианте осуществления изобретения концентрация ацетата или гистидина в указанном препарате составляет приблизительно 10 мМ.

В еще другом варианте осуществления изобретения концентрация D-маннита или трегалозы в указанном препарате составляет приблизительно 280 мМ или для комбинации аргинина HCl и глутаминовой кислоты концентрация аргинина HCl составляет приблизительно 150 мМ и концентрация глутаминовой кислоты составляет приблизительно 50 мМ.

В еще другом варианте осуществления изобретения концентрация полоксамера 188 или полисорбата 20 в указанном препарате составляет приблизительно 0,5 мг/мл.

В еще другом варианте осуществления изобретения значение pH указанного препарата равно от 5,2 ($\pm 0,1$) до 5,5 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит ацетат в концентрации приблизительно 10 мМ и не содержит какой-либо другой буферный агент.

В другом предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит D-маннит или трегалозу в концентрации приблизительно 280 мМ и не содержит какого-либо другого стабилизатора.

В еще другом предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит полисорбат 20 или полоксамер 188 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл и не содержит какое-либо другое поверхностно-активное вещество.

В варианте осуществления изобретения указанный препарат включает

(I) авелумаб в концентрации приблизительно 10 мг/мл в качестве антитела;

(II) ацетат в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента;

(III) D-маннит или трегалозу в концентрации приблизительно 280 мМ в качестве стабилизатора;

(IV) полисорбат 20 или полоксамер 188 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве по-

верхностно-активного вещества; и

не содержит метионин и имеет pH приблизительно 5,5.

В предпочтительном варианте осуществления указанный препарат включает

(I) авелумаб в концентрации 10 мг/мл;

(II) ацетат в концентрации 10 мМ;

(III) D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 или полуксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл; и имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 10 мг/мл;

(II) тригидрат ацетата натрия в концентрации 10 мМ;

(III) D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 или полуксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) HCl для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве растворителя; и имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 10 мг/мл;

(II) тригидрат ацетата натрия в концентрации 10 мМ;

(III) дигидрат трегалозы в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) HCl для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).

В более предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 10 мг/мл;

(II) тригидрат ацетата натрия в концентрации 10 мМ;

(III) D-маннит в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) HCl для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и

имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).

В другом варианте осуществления изобретения, указанный препарат включает

(I) авелумаб в концентрации приблизительно 20 мг/мл в качестве антитела;

(II) ацетат в концентрации приблизительно 10 мМ в качестве буферного агента;

(III) D-маннит или трегалозу в концентрации приблизительно 280 мМ в качестве стабилизатора;

(IV) полисорбат 20 или полуксамер 188 в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл в качестве по-

верхностно-активного вещества; и

не содержит метионин и имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления указанный препарат включает

(I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(II) ацетат в концентрации 10 мМ;

(III) D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 или полуксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл; и

имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления указанный препарат включает

(I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(II) уксусную кислоту в концентрации 10 мМ;

(III) D-маннит или дигидрат трегалозы в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 или полуксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) ацетат натрия для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).

В более предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(II) уксусную кислоту в концентрации 10 мМ;

(III) D-маннит в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) ацетат натрия для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и

имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).

В более предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(II) уксусную кислоту в концентрации 10 мМ;

(III) дигидрат трегалозы в концентрации 280 мМ;

(IV) полисорбат 20 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) ацетат натрия для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).

В более предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(II) уксусную кислоту в концентрации 10 mM;

(III) D-маннит в концентрации 280 mM;

(IV) полоксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) ацетат натрия для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).

В более предпочтительном варианте осуществления указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(II) уксусную кислоту в концентрации 10 mM;

(III) дигидрат трегалозы в концентрации 280 mM;

(IV) полоксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) ацетат натрия для доведения pH;

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления, указанный препарат содержит

(I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;

(II) уксусную кислоту в концентрации 10 mM (0,6 мг/мл);

(III) D-маннит в концентрации 280 mM (51 мг/мл);

(IV) полисорбат 20 в концентрации 0,5 мг/мл;

(V) гидроксид натрия в концентрации 7,5 mM (0,3 мг/мл);

(VI) воду (для инъекций) в качестве разбавителя; и

имеет pH от 5,0 до 5,6, предпочтительно 5,2 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления последний препарат получен путем комбинирования

(I) 20 мг/мл авелумаба;

(II) 0,6 мг/мл ледяной уксусной кислоты;

(III) 51 мг/мл D-маннита;

(IV) 0,5 мг/мл полисорбата 20;

(V) 0,3 мг/мл гидроксида натрия;

(VI) воды (для инъекций) в качестве разбавителя;

для получения желательного объема препарата.

В дальнейшем варианте осуществления изобретение охватывает водный фармацевтический препарат антителя, значение pH которого доводят с помощью гидроксида натрия. Следовательно, препарат содержит

авелумаб в концентрации 20 мг/мл в качестве активного компонента; и

ледяную уксусную кислоту, D-маннит, полисорбат 20, гидроксид натрия и воду для инъекций в качестве наполнителей,

где препарат имеет pH от 5,0 до 5,6, предпочтительно 5,2 ($\pm 0,1$).

В предпочтительном варианте осуществления препарат имеет осмолярность в диапазоне от 270 до 330 мОсм/кг.

В варианте осуществления изобретения указанный авелумаб в препаратах, как описано выше, имеет последовательность тяжелой цепи, как показано на фиг. 1a (SEQ ID NO: 1) или фиг. 1b (SEQ ID NO: 2), последовательность легкой цепи, как представлено на фиг. 2 (SEQ ID NO: 3), и несет гликозилирование на Asn300, который содержит FA2 и FA2G1 в качестве основных гликановых видов, имеющих соединенными общими >70% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет общими 44-54% и указанный FA2G1 имеет общими 25-41% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет общими 47-52% и указанный FA2G1 имеет общими 29-37% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет общими приблизительно 49% и указанный FA2G1 имеет общими от приблизительно 30% до приблизительно 35% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления гликозилирование авелумаба дополнительно содержит в качестве второстепенных видов гликанов A2 с общими <5%, A2G1 с общими <5%, A2G2 с общими <5% и FA2G2 с общими <7% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления в гликозилировании авелумаба указанный A2 имеет общими 3-5%, указанный A2G1 имеет общими <4%, указанный A2G2 имеет общими <3% и указанный FA2G2 имеет общими 5-6% всех видов гликанов.

В предпочтительном варианте осуществления в гликозилировании авелумаба указанный A2 имеет

общими от приблизительно 3,5% до приблизительно 4,5%, указанный A2G1 имеет общими от приблизительно 0,5% до приблизительно 3,5%, указанный A2G2 имеет общими <2,5% и указанный FA2G2 имеет общими приблизительно 5,5% всех видов гликанов.

В варианте осуществления изобретения указанный авелумаб в препарате, как описано выше, имеет последовательность тяжелой цепи, представленной на фиг. 1b (SEQ ID NO: 2).

В варианте осуществления изобретения препарат авелумаба, как описано выше, предназначен для внутривенного (в/в) введения.

Устройство для доставки лекарственного средства.

Во втором аспекте настоящее изобретение обеспечивает устройство для доставки лекарственного средства, которое содержит жидкую фармацевтическую композицию, как описано в настоящей заявке. Подходящее устройство для доставки лекарственного средства содержит камеру, в которой хранится фармацевтическая композиция. Подходящее устройство для доставки лекарственного средства является стерильным.

Устройство для доставки лекарственного средства может представлять собой флакон, ампулу, шприц, шприц-ручку (например, по существу инкорпорированный в шприц) или в/в (внутривенный) контейнер.

Водные фармацевтические препараты вводят парентерально, предпочтительно путем подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, в/в инъекции или в/в инфузии. Наиболее предпочтительным путем введения является в/в инфузия.

В предпочтительном варианте осуществления устройством для доставки лекарственного средства является флакон, содержащий препарат, как описано выше.

В более предпочтительном варианте осуществления указанный флакон содержит 200 мг авелумаба в 10 мл раствора для концентрации 20 мг/мл.

В еще более предпочтительном варианте осуществления флакон представляет собой стеклянный флакон.

Медицинское лечение.

В третьем аспекте изобретение обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования, который включает введение препарата, как описано выше, пациенту.

В варианте осуществления изобретения злокачественное новообразование, подвергаемое лечению, выбирают из немелкоклеточного рака легких, уротелиальной карциномы, рака мочевого пузыря, мезотелиомы, карциномы из клеток Меркеля, рака желудка или гастроэзофагеального перехода, рака яичников, рака молочной железы, тимомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы, плоскоклеточного рака области головы и шеи, почечно-клеточной карциномы, меланомы и/или классической лимфомы Ходжкина.

Сокращения.

ANOVA - дисперсионный анализ.

CD - круговой дихроизм.

CE - капиллярный электрофорез.

DoE - схема экспериментов.

DP - лекарственный продукт.

DS - лекарственное вещество.

DSF - дифференциальная сканирующая флуориметрия.

DTT - дитиотреитол.

ESI - электрораспылительная ионизация.

HILIC - жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий.

HMW - высокий молекулярный вес.

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография.

iCE - капиллярное изоэлектрическое фокусирование.

ЖХ - жидкостная хроматография.

LMW - низкий молекулярный вес.

MALDI - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация.

МС - масс-спектрометрия.

NTU - нефелометрические единицы мутности.

ОП - оптическая плотность.

PBS - полибуферный солевой раствор.

PES - полиэфирсульфон.

PVDF - поливинилиден фторид.

SDS-PAGE - додецилсульфат натрия - электрофорез в полиакриламидном геле.

SE - эксклюзионный.

TOF - время пролета.

UPLC - сверхэффективная жидкостная хроматография.

ОВ - остаточная влажность.

УФ - ультрафиолет.

Примеры

Методы, используемые для определения стабильности.

Для оценки стабильности тестируемых препаратов антитела и выбора наилучших кандидатов определяли термический стресс, механический стресс, воздействие света, осмолярность, мутность, содержание белка, суммарные агрегаты, фрагментация, pH, изоформы, круговой дихроизм, частицы, невидимые невооруженным глазом и биологическую активность в качестве параметров стабильности в соответствии со следующими протоколами.

Термический стресс.

При 40°C образцы в исходном флаконе-контейнере инкубировали в термостатическом кабинете при температуре 40±2°C (ОВ 75±5%) и отбирали в заранее контрольные установленные моменты времени. При 25°C образцы в исходном флаконе-контейнере инкубировали в термостатическом кабинете при температуре 25±2°C (ОВ 60±5%) и отбирали в заранее контрольные установленные моменты времени.

Механический стресс.

Образцы в исходном флаконе-контейнере помещали на орбитальный встряхиватель, выдерживая при 300 об/мин в течение вплоть до 24 ч (комнатная температура).

Воздействие света.

Образцы в исходном флаконе-контейнере подвергали воздействию источника света в течение 7 ч, доводя уровень облучения на приборе Suntest до 765 Вт/м² (длина волны облучения в диапазоне от 320 до 800 нм).

Осмолярность.

Нормальная плазма человека имеет осмолярность приблизительно 280 мОсм/кг (Medical Physiology - Principles for Clinical Medicine. Edited by by Rodney A. Rhoades PhD, David R. Bell PhD). Как правило, целевыми являются растворы с осмолярностью, близкой к 300 мОсм/кг, при разработке парентеральных препаратов. Приемлемыми интервалами (как для технических характеристик продукции) являются 250-400 мОсм/кг.

В данном случае осмолярность анализировали с помощью криоскопического метода, определяющего понижение точки замерзания водных растворов после добавления растворенных компонентов. Количество растворенных компонентов и, следовательно, наблюдаемая значение осмолярности пропорционально наблюдаемому понижению точки замерзания составного раствора.

Мутность.

Мутность растворов определяли с помощью нефелометра со способностью измерять рассеянный или ослабленный свет (Hach Lange Model 2100AN). Приблизительно 3 мл раствора в кюветах с уменьшенным объемом облучали с помощью прибора со светоиспускающим диодом (LED) 870±30 нм. Детектор мониторил рассеянный свет и обеспечивал определение мутности (NTU) раствора путем сравнения с сериями стандартов с известной мутностью.

Содержание белка.

Содержание белка определяли с помощью оптической плотности растворов (разведенных до ~0,5 мг/мл концентрации белка с помощью релевантного буфера) при 280 и 320 нм в кварцевых кюветах с длиной траектории 1 см. Учитывая коэффициент молярной экстинкции 1,46 см²/мг, концентрацию белка получали путем применения формулы (A280-A320)/(1,46 см²/мг×1 см).

Суммарные агрегаты.

Количество агрегатов определяли с помощью метода эксклюзионной SE-ВЭЖХ. Объем образца 20 мкл (образец, разведенный приблизительно до 0,5 мл с помощью PBS) инъецировали в TSK гель Super SW3000 4,6 мм×30 см (код. 18675), выдерживаемый при температуре 22±5°C при скорости потока 0,35 мл/мин (подвижной фазой был 50 мМ фосфат натрия+0,4 перхлорат натрия при pH 6,3±0,1). УФ обнаружение при 214 нм.

Фрагментация.

Низкомолекулярные виды (или фрагменты) определяли с помощью Bioanalyzer. Образцы анализировали при концентрации в диапазоне 1,25-3,75 мг/мл (разведения осуществляли очищенной водой). 3 мкл каждого разведенного образца сливали в 2 мкл соответствующего образца буфера (с добавлением DTT, если тесты осуществляли в восстанавливающих условиях) и 1 мкл 60 мМ раствора малеимида. Образцы нагревали в течение 5 мин при 70°C, затем добавляли 84 мкл очищенной воды и растворы перемешивали вихревым способом и центрифугировали. 6 мкл загружали на чип (0,25-0,75 мкг белка). Чип помещали в Agilent 2100 Bioanalyzer и анализ начинали в течение последующих 5 мин.

Изоформы.

Распределение изоформ определяли с помощью iCE. Использовали Fc покрытый капиллярный картридж (внутренний диаметр 100 мкм и длина 50 мм). Разделение осуществляли, используя 100 мМ NaOH раствор в 0,1% метилцеллюлозе в качестве катодного раствора и 80 мМ о-фосфорную кислоту в 0,1% метилцеллюлозе в качестве анодного раствора. Образцы приготавливали, начиная с 80 мкл раствора мас-тер-микс (полученного смешиванием 700 мкл 0,1% метилцеллюлозы, 10 мкл Pharmalyte 5-8,

70 мкл Pharmalyte 8-10,5, 10 мкл 7,65 pI маркера и 10 мкл 9,77 pI маркера), к которому добавляли подходящий объем промытого образца авелумаба (что соответствует 200 мкг белка после промывки для удаления компонентов препарата). Добавляли количество очищенной воды, что соответствует (120 мкл - объем промытого образца авелумаба, добавленного на предыдущей стадии). Разделение осуществляли при длине волны обнаружения 280 нм, устанавливая время предварительной фокусировки и фокусировки 1 и 15 мин соответственно и напряжения предварительной фокусировки и фокусировки 1500 В и 3000 В соответственно. Образцы инъецировали под давлением 1000 мбар.

pH определяли с помощью общепринятой потенциометрии.

Круговой дихроизм (CD).

Исследования третичной структуры авелумаба осуществляли, используя спектрополяриметр согласно Jasco (мод. J810) в ближнем УФ-диапазоне (320-250 нм). Образцы разводили до 1,5 мг/мл концентрации белка с помощью очищенной воды и после заполнения в кварцевые кюветы с длиной траектории 1 см анализировали при комнатной температуре, скорости сканирования 20 нм/мин, шаге данных 0,5 нм, времени интеграции 8 с и стандартной чувствительности.

Частицы, невидимые невооруженным глазом.

Частицы, невидимые невооруженным глазом, подсчитывали с помощью технологии исследования частиц методом затенения, используя счетчик частиц Pamas SVSS-C. Образцы разводили 5-кратно очищенной водой для получения конечного объема для тестирования по меньшей мере 25 мл.

Биологическая активность.

Для исследований долгосрочной стабильности, описанных в примере 5, измеряли биологическую активность в качестве дополнительного параметра стабильности.

Используемый способ основывался на способности авелумаба, абсорбированного на планшете ELISA, связывать дозозависимым образом его антиген PD-L1, презентируемый на клеточной линии HEK-293 (hPDL1, перманентно трансфектированной с помощью PD-L1). Используемыми дозами были 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 и 3,12 нг/мл. Из полученных данных рассчитывали значения EC₅₀. Биологическую активность (эффективность) образцов выражали в виде процента биологической активности образца относительно стандарта и рассчитывали следующим образом:

$$\text{Эффективность (образца) [\%]} = (\text{EC}_{50} (\text{образца}) / \text{EC}_{50} (\text{стандарта})) \times 100,7$$

Способы приготовления.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ приготовления водного фармацевтического препарата, как описано в настоящей заявке. Способ подходяще включает смешивание вместе в любом предпочтительном порядке, который считается целесообразным, любых релевантных компонентов, необходимых для образования водного фармацевтического препарата. Квалифицированный специалист может сослаться на примеры или техники, хорошо известные в данной области техники, для образования водных фармацевтических препаратов (в особенности тех, которые предназначены для инъекции с помощью шприца или в/в инфузии).

Способ может включать сначала приготовление предварительной смеси (или предварительного раствора) некоторых или всех компонентов (необязательно с некоторыми или всеми разбавителями) за исключением авелумаба, и затем авелумаб сам может быть смешан (необязательно с или предварительного раствора в некоторых разбавителях) с предварительной смесью (или предварительным раствором) для получения водного фармацевтического препарата или композиции, к которому(которой) затем добавляют конечные компоненты для получения конечного водного фармацевтического препарата. Предпочтительно способ включает образование буферной системы, подходяще буферной системы, которая содержит буферный агент, как описано в настоящей заявке. Буферная система подходяще образуется в предварительной смеси перед добавлением авелумаба. Буферная система может быть образована путем простого смешивания буферного агента (поставляемого готовым к использованию) с его кислотным/щелочным конъюгатом (подходяще в соответствующих относительных количествах для обеспечения желательного pH; это может быть определено квалифицированным специалистом либо теоретически или экспериментально). В случае ацетатной буферной системы это обозначает, например, смешивание ацетата натрия с HCl или смешивание уксусной кислоты с NaOH или ацетатом. Значением pH либо предварительной смеси конечного водного фармацевтического препарата может быть с осторожностью доведено путем добавления требуемого количества основания или кислоты или количества буферного агента или кислотного/щелочного конъюгата.

В определенных вариантах осуществления изобретения, буферный агент и/или буферную систему предварительно образуют в виде раздельной смеси и буферную систему переносят к предшественнику водного фармацевтического препарата (который содержит некоторые или все компоненты, не считая буферного агента и/или буферной системы, подходяще который(ая) содержит авелумаб и потенциально только авелумаб) посредством замены буфера (например, с использованием диафильтрации до достижения релевантных концентраций или осмолярности). После этого можно добавлять дополнительные наполнители, при необходимости для получения конечной жидкой фармацевтической композиции. Значения pH может корректироваться один раз или перед присутствием всех компонентов.

Любой, некоторые или все компоненты могут быть предварительно растворены или предвари-

но смешаны с разбавителем перед смешиванием с другими компонентами.

Конечный водный фармацевтический препарат может фильтроваться подходяще для удаления взвешенных частиц. Подходяще фильтрацию осуществляют через фильтры размером при или ниже 1 мкм, подходяще при 0,22 мкм. Подходяще фильтрацию осуществлению с помощью либо PES фильтров или PVDF фильтров, подходяще с помощью 0,22 мкм PES фильтров.

Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятным, как можно использовать водный фармацевтический препарат для приготовления в/в раствора таким образом, чтобы лекарственное антитело можно было вводить внутривенно.

Приготовление в/в раствора типично включает определенное количество раствора, которое было отобрано из контейнеров с физиологическим раствором (например, 0,9- или 0,45%-ным физиологическим раствором) с помощью пластикового шприца (PP) и иглы и заменено на водный фармацевтический препарат. Заменяемое количество раствора будет зависеть от веса тела пациентов.

Пример 1. Структура авелумаба.

1.1. Первичная структура.

Авелумаб представляет собой IgG молекулы с двумя тяжелыми и двумя легкими цепями. Аминокислотные последовательности двух цепей представлены на фиг. 1a (SEQ ID NO: 1)/фиг. 1b (SEQ ID NO: 2) и 2 (SEQ ID NO: 3) соответственно.

1.2. Вторичная структура.

ЖХ-МС и МС/МС методы использовали для подтверждения интактных цепей молекулы и присутствия посттрансляционных модификаций для белков. Вторичная структура субъединиц молекулы авелумаба представлены на фигуре.

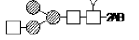
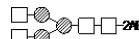
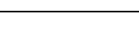
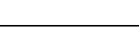
Как подтверждено с помощью UPLC-Q-TOF масс-спектрометрии пептидов, полученных путем расщепления трипсином, дисульфидные связи Cys21-Cys96, Cys21-Cys90, Cys147-Cys203, Cys138-Cys197, Cys215-Cys223, Cys229-Cys229, Cys232-Cys232, Cys264-Cys324 и Cys370-Cys428 образуют девять типичных IgG моделей связывания.

1.3. Гликозилирование.

Молекула содержит один сайт N-гликозилирования на Asn300 тяжелой цепи. Как определено с помощью картирования пептида, основная структура, идентифицированная путем MALDI-TOF, имеет комплексное, двухантенного типа ядро фукозилированного олигосахарида с нулем (G0F), одним (G1F), или двумя (G2F) галактозными остатками. Основными видами являются G0F и G1F. Гликаны авелумаба, флуоресцентно меченные с помощью 2-аминобензамида, анализировали путем HILIC-UPLC-ESI-Q-TOF. На фиг. 4 показан UPLC профиль обнаруженных видов гликанов.

Таблица 1

Идентификация пика 2AB HILIC-UPLC хроматограммы

Пик	RT (мин)	Измеренный MB	Ожидаемый MB	Идентификация	Оксфордская номенклатура	Идентификация путем
1a	5,99	1380,52 (M+H)	1380,54 (M+H)		FA1	Вручную идентифицирован путем МС
2	6,01	1437,54	1437,56		A2	Вручную идентифицирован путем МС
3	7,02	1583,74 (M+H)	1583,62 (M+H)		FA2	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
4	7,77	1355,57 (M+H)	1355,51 (M+H)		M5	Вручную идентифицирован путем МС
5	8,16	1599,77 (M+H)	1599,62 (M+H)		A2G1	Вручную идентифицирован путем МС
6	9,82	1744,79	1744,67		FA2G1	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
		1462,90	1462,54		FA2 свободный Конеч	GlycoworkBench идентифицирован путем МС

7	10,07	1744,80	1744,67		FA2G1	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
		1462,91	1462,54		FA2 свободный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем МС
8	10,44	1462,90	1462,54		FA 2 свободный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем МС
		1744,79	1744,67		FA2G1	Вручную идентифицирован путем МС
9	12,15	1177,50 (M+H)	1177,46 (M+H)		FM3	GlycoworkBench идентифицирован путем МС
10	16,66	Нет ионизации	Нет ионизации			
11	13,42	1906,33	1906,72		FA2G2	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
		1624,71	1624,59		FA2G1 свободный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем МС
12	13,71	954,40 (M+2H)/2	954,36 (M+2H)/2		FA2G2	Вручную идентифицирован путем МС
		1626,69	1626,61		FA2G1 красный Конец	GlycoworkBench идентифицирован путем МС
13	17,46	1099,97 (M+2H)/2	1099,91 (M+2H)/2		FA2G2S	МС в источнике фрагментации путем GlycoworkBench
14	18,54	1079,91 (M+2HJ)/2	1079,86 (M+2H)/2		FA2G2S свободный Конец+S (возможно-небольшие следы)	Вручную идентифицирован путем МС
15	21,04	2489,05	2488,91		FA2G2S2	Вручную идентифицирован путем МС

Геометрические формы, представляющие гликановые связывающие блоки, соответствуют следующим молекулярным структурам:



Man: манноза;

Fuc: фукоза;

Gal: галактоза;

GalNAc: N-Ацетилгалактозамин;

NANA: сиаловая кислота;

NGNA: N-гликолилнейраминавая кислота.

Используемая номенклатура гликанов соответствует оксфордскому обозначению, как предложено Harvey et al. (Proteomics, 2009, 9, 3796-3801). В видах, содержащий фукозу (FA2, FA2G1, FA2G2), Fuc-GlcNAc связь представляет собой α 1-6. В видах, имеющих концевой GlcNAc, GlcNAc-Man связь представляет собой β 1-2. В видах, содержащих галактозу, Gal-GlcNAc связь представляет собой β 1-4.

Описанный хроматографический профиль был интегрирован, и получили распределение видов гликанов авелумаба, как показано в табл. 2а.

Таблица 2а

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2	M5**
----	-----	------	-------	------	-------	------

3,6	48,7	3,4	35,6	2,3	5,4	1,0
-----	------	-----	------	-----	-----	-----

** Возможно, манноза 5, совместная элюция с двухантенными много-галактозилированными видами.

Анализ картирования гликанов подтвердил идентификацию, осуществленную путем картирования пептида (что предоставляет возможность идентифицировать два основных вида гликанов) дополнительно к вторичным и второстепенным видам, которые также были охарактеризованы с помощью этого метода, специфического для анализа гликанов.

В другом измерении наблюдали распределение следующих видов гликанов.

Таблица 2b

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2
4,0	50,2	1,0	30,0	0,1	5,6

Пример 2. Скрининг DoE1.

В первой схеме эксперимента скрининга DoE1 в дозе 10 мг/мл авелумаба оценивали влияние нескольких факторов, таких как изменение типа буфера/pH, наполнителей, типа поверхностно-активного вещества и релевантной концентрации. Исследование привело к выбору оптимальных условий, в которых можно максимизировать стабильность белка.

В DoE1 для исследования учитывали следующие факторы:

тип буфера и pH: ацетатный, цитратный и гистидиновый буферы оценивали в диапазоне pH 5,0-6,0; наполнители: рассматривали 3 различных наполнителя для получения указаний, будут ли сахара/полиолы или аминокислоты предпочтительными для приготовления рецептуры в формуле;

тип поверхностно-активного вещества и концентрация: два альтернативных поверхностно-активных вещества (твин 20 и полоксамер 188) оценивали при различных концентрациях (0-1 мг/мл).

Исследование осуществляли в DIN6R флаконах (Schott) при концентрации белка 10 мг/мл с объемами наполнения 8 мл (80 мг/флакон). Табл. 3 иллюстрирует выбор исследуемых DoE1 формул. DoE1 предоставляет возможность выбрать подходящий буфер/pH, тип наполнителя и тип поверхностно-активного вещества для будущего анализа, которые использовали в последующем DoE2 исследовании, описанном в примере 3.

Таблица 3

Препараты DoE1 скрининга

ИД	Авелу- маб (мг/мл)	pH	Буфер (10 мМ)	Наполнитель	Поверхностно- активное вещество	Концентрация поверхностно- активного вещества (мг/мл)
DoE1-1	10	5,00	Ацетат	Маннит (51 мг/мл ¹)	Полоксамер 188	0,5
DoE1-2	10	5,00	Ацетат	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл ¹)	Твин 20	0,5
DoE1-3	10	5,00	Цитрат	Маннит (51 мг/мл ¹)	Полоксамер 188	0,2
DoE1-4	10	5,25	Ацетат	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл ¹)	Твин 20	0,2
DoE1-5	10	5,25	Ацетат	Аргинин HCl (21,1 мг/мл ²) + Глутаминовая кислота (7,4 мг/мл ³)	Полоксамер 188	0,2
DoE1-6	10	5,25	Цитрат	Аргинин HCl (21,1 мг/мл ²) + Глутаминовая кислота (7,4 мг/мл ³)	-	-
DoE1-7	10	5,25	Цитрат	Маннит (51 мг/мл ¹)	Твин 20	0,2
DoE1-8	10	5,50	Ацетат	Маннит (51 мг/мл ¹)	Твин 20	0,5
DoE1-9	10	5,50	Ацетат	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл ¹)	-	-
DoE1-10	10	5,50	Цитрат	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл ¹)	Полоксамер 188	1
DoE1-11	10	5,50	Цитрат	Аргинин HCl (21,1 мг/мл ²) + Глутаминовая кислота (7,4 мг/мл ³)	Твин 20	0,2
DoE1-12	10	5,75	Цитрат	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл)	Твин 20	1
DoE1-13	10	5,75	Цитрат	Маннит (51 мг/мл)	-	-
DoE1-	10	5,75	Гистидин	Аргинин HCl (21,1	Полоксамер	0,5

14				мг/мл)+ Глутаминовая кислота (7,4 мг/мл)	188	
DoE1-15	10	5,75	Гистидин	Маннит (51 мг/мл)	Твин 20	1
DoE1-16	10	6,00	Цитрат	Аргинин HCl (21,1 мг/мл)+ Глутаминовая кислота (7,4 мг/мл)	Твин 20	1
DoE1-17	10	6,00	Цитрат	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл)	Полоксамер 188	0,2
DoE1-18	10	6,00	Гистидин	Аргинин HCl (21,1 мг/мл)+ Глутаминовая кислота (7,4 мг/мл)	Полоксамер 188	1
DoE1-19	10	6,00	Гистидин	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл)	Полоксамер 188	0,5
Сравнение ⁴	10	5,50	Ацетат	Маннит (51 мг/мл)/L-Метионин (0,21 мг/мл)	Твин 20	0,5

(1) Соответствует 280 мМ.

(2) Соответствует 150 мМ.

(3) Соответствует 50 мМ

(4) Препарат, описанный в WO 2013079174.

2.1. Приготовление.

В предварительном приготовленном лекарственном веществе (DS) (10 ($\pm$ 1) мг/мл авелумаб, 1,36 мг/мл тригидрат ацетата натрия, 51 мг/мл D-маннит, 0,21 мг/мл L-метионин, соляная кислота q.b. до pH 5,5) заменяли буфер путем фильтрования тангенциальным потоком (используя кассеты Pellicon XL Biotech с отсекающей 10 кДа) в трех буферах: 10 мМ ацетат натрия pH 5,0, 10 мМ цитрат натрия pH 5,0 и 10 мМ гистидин pH 5,75 до достижения трехкратной замены объемов. На каждой стадии DS раствор разводили 5-кратно релевантным буфером. Конечная целевая концентрация белка в замененном DS материала составляла >10 мг/мл. Затем добавляли требуемые наполнители к релевантному DS материалу с замененным буфером, pH и вес конечного раствора доводили до целевого таким образом, что получали DP композиции, перечисленные в табл. 3.

Последовательность добавления ингредиентов в заменяемый DS растворам была следующей:

добавление D-маннита или дигидрата трегалозы или аргинина HCl+глутаминовой кислоты к заменяемому DS раствору;

перемешивание до полного растворения;

добавление L-метионина и перемешивание до полного растворения (только для сравнительного препарата);

добавление полоксамера 188 или полисорбата 20 (50 мг/мл маточный раствор);

перемешивание до полного растворения;

проверка pH и доведение до целевого с помощью гидроксида натрия.

Растворы лекарственного продукта (DP) заполняли (8 мл) в DIN6R флаконы (Schott).

При визуальной проверке во время процесса диафильтрации DS было обнаружено, что буфер цитрата натрия вызывает в целом более высокую опалесценцию, в то время как заметно более прозрачные растворы получали при осуществлении замены на буферы ацетата натрия и гистидина.

В табл. 4 представлены результаты экспериментов, осуществленных для определения восстановления белка, осмолярности (Osmomat 030/D, Gonotec) и мутности трех DS материалов при замене буфера. Получали удовлетворительные значения восстановления белка (>89%) и конечной осмолярности (<61 мОсм/кг). Анализы мутности подтверждали более высокую опалесценцию DS, замененных в цитрате натрия.

Таблица 4

Результаты экспериментов восстановления (согласно ОП), осмолярности и мутности, осуществленных на DS материалах, после замены буфера

Буфер	Восстановление (%)	Осмолярность (мОсм/кг)	Мутность (NTU)
Ацетат	96	29	3
Цитрат	89	38	30
Гистидин	93	61	6

2.2. Осмолярность.

Значения осмолярности DP препаратов, релевантные DoE1 скринингу, содержались в диапазоне 299-396 мОсм/кг, где большинство препаратов имели осмолярности ниже приблизительно 360 мОсм/кг. Измерения осуществляли во время 0 до завершения приготовления. Полученные значения согласовались с целевым (приемлемый диапазон 250-400 мОсм/кг). Растворы, содержащие дигидрат трегалозы, проявили более высокие значения (близкие к 400 мОсм/кг) благодаря влиянию этого компонента на точку замерзания и последующее (очевидное) повышение осмолярности.

2.3. Термический стресс.

2.3.1. Содержание белка.

Как было определено согласно измерениям ОП, значения содержания во время 0 согласовались с теоретическими значениями (10 мг/мл). Не наблюдали существенных изменений через 1 месяц при 40°C.

2.3.2. Суммарные агрегаты.

Суммарные агрегаты DoE1 препаратов определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ во время 0 и через 2 и 4 недели хранения при 40°C. Не было обнаружено статистически достоверных вариаций относительно агрегатов при термическом стрессе при 40°C, что, следовательно, указывает на то, что различные тестируемые матрицы приводят к инвариантным/пренебрежительно малым изменениям характера агрегации.

2.3.3. Фрагментация.

Фрагментация с помощью Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent) в DoE1 препаратах определяли во время 0 и через 2 и 4 недели хранения при 40°C. Полученные данные указывают на то, что pH является решающим фактором для фрагментации белка при 40°C. При pH>5,75 фрагментация приводит к существенному повышению (наиболее типически в препаратах от DoE1-13 до DoE1-19 в цитратном и гистидиновом буферах).

Препараты, в которых присутствуют наименьшие изменения фрагментации, представляют собой те, которые находятся в диапазоне pH 5,0-5,75 предпочтительно в присутствии либо D-маннита или дигидрата трегалозы (DoE1-2-8-9-10-12).

Препарат DoE1-7 (цитратный буфер при pH 5,25 в присутствии D-маннита и твин 20) представляет аномальные профили с согласуемым удвоением пика (некоторые проблемы могут быть связаны с применением цитрата в качестве буферного агента касательно фрагментации, дополнительно к тем, которые уже были описаны при приготовлении с повышением мутности/опалесценции).

2.3.4. Мутность.

Мутность путем нефелометрии в DoE1 препаратах определяли во время 0 и через 2 и 4 недели хранения при 40°C.

Опалесценцию/сильную опалесценцию стабильно наблюдали во всех DP препаратах, содержащих цитрат в качестве pH буферного агента.

Было обнаружено, что все препараты в ацетате натрия и гистидине являются прозрачными/незначительно опалесцентными с отсутствием существенных изменений в течение 1 месяца хранения при 40°C.

2.3.5. pH.

Не наблюдали изменений значения pH.

2.4. Механический стресс.

DoE1 препараты подвергали 24-часовому орбитальному встряхиванию во флаконах при 300 об/мин (комнатная температура). После окончания стресса образцы тестировали относительно агрегатов и опалесценции.

2.4.1. Суммарные агрегаты.

Суммарные агрегаты определяли согласно эксклюзионной ВЭЖХ после механического стресса и сравнивали с результатами для времени 0. Не наблюдали существенных изменений.

2.4.2. Мутность.

Мутность DoE1 препаратов определяли с помощью нефелометрии (2100AN IS, Nach Lange) после механического стресса и сравнивали с результатами для времени 0. Данные оценивали с помощью ANOVA и наблюдали умеренное достоверное влияние вследствие присутствия поверхностно-активного вещества ($0,01 < p\text{-значение} < 0,05$). Твин 20 или полоксамер 188 могут помочь минимизировать изменение мутности после механического стресса.

2.5. Воздействие света.

DoE1 препараты подвергали 7-часовому облучению при 765 Вт/м² (Suntest CPS, Atlas). После окончания светового стресса образцы тестировали относительно агрегатов, опалесценции, pH и профиля изоформ.

2.5.1. Суммарные агрегаты.

Используя эксклюзионную ВЭЖХ (Alliance, Waters) наблюдали незначительные вариации наиболее часто при использовании цитрата натрия буфер ($p\text{-значение} < 0,01$).

Ацетат натрия и гистидин являются предпочтительными буферами для минимизации изменений агрегации.

2.5.2. Мутность.

Как определяли путем нефелометрии, наиболее очевидное повышение мутности типично обнаруживали в цитратном буфере при значениях pH>5,75 (DoE1-13 и DoE1-16 и DoE1-17).

2.5.3. pH.

Не наблюдали изменений.

2.6. DoE1: выводы.

Данные, полученные в рамках термического, механического и светового стресса, оценивали для определения условий, которые обеспечивают максимальную резистентность белка к стрессам.

Результаты анализов представлены в табл. 5.

Таблица 5

Компоненты высоко стабилизированных
препаратов авелумаба при 10 мг/мл концентрация белка

№ ИД	Буфер	pH	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество
Экстраполированный	10 мМ Ацетат	5,20	Дигидрат трегалозы (280 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)
DoE1-4	10 мМ Ацетат	5,25	Дигидрат трегалозы (280 мМ)	Твин 20 (0,2 мг/мл)

Экстраполированный препарат выделенный зеленым (№ ИД=экстраполированный), в то время как также описана наиболее сходная форма в тестируемом поднаборе, которая представляет собой DoE1-4. Эти данные свидетельствуют о том, что ацетатный буфер pH 5,0-5,5 обеспечивает улучшенную стабильность белка и что присутствие поверхностно-активного вещества, такого как либо твин 20 или полоксамер 188, при концентрациях выше 0,2 мг/мл также является важным для улучшенной стабильности белка в препарате.

Пример 3.

Целью второго DoE скрининга "DoE2" было точная корректировка препаратов, выбранных при осуществлении DoE1 и одновременном повышении концентрации белка до 20 мг/мл.

Для этого второго скрининга препаратов тестировали шесть препаратов при 20 мг/мл концентрации белка, изменяя наполнители (D-маннит, дигидрат трегалозы) и поверхностно-активное вещество (не содержит поверхностно-активного вещества, полоксамер 188 или полисорбат 20 при концентрации 0,5 мг/мл) в присутствии 10 мМ буфера ацетата натрия pH 5,2 после термического стресса (1 месяц при 40°C, 8 недель при 25 и 2-8°C) и механического встряхивания (24 ч при 300 об/мин, комнатная температура). Релевантные композиции перечислены в табл. 6.

Таблица 6

Скрининг DoE2 препаратов (концентрация белка=20 мг/мл)

ИД	Авелумаб (мг/мл)	Буфер	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество
DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Маннит (51 мг/мл ¹)	-
DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл ¹)	-
DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Маннит (51 мг/мл ¹)	Твин 20 (0,5 мг/мл)
DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл ¹)	Твин 20 (0,5 мг/мл)
DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Маннит (51 мг/мл ¹)	Полоксамер 188 (0,5 мг/мл)
DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы (106 мг/мл ¹)	Полоксамер 188 (0,5 мг/мл)
DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	Маннит (51 мг/мл ¹)	Твин 20 (0,5 мг/мл)
Сравнение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	Маннит (51 мг/мл)/L-Метионин (0,21 мг/мл)	Твин 20 (0,5 мг/мл)

DoE2 исследование осуществляли для сравнительной оценки влияния D-маннита относительно дигидрата трегалозы и воздействия поверхностно-активного вещества (твин 20 или полоксамер 188 либо без поверхностно-активного вещества) в буфере ацетата натрия при pH 5,2 при увеличенной концентрации белка 20 мг/мл. В схему были включены два pH 5,5 сравнительных образца: "Сравнение" с L-метионином и препарат сравнения без L-метионина, соответствующий DoE1-8.

3.1. Приготовление.

Использовали предварительно приготовленное лекарственное вещество (DS) (27,1 мг/мл авелумаб в 10 мМ ацетате натрия pH 5,5). Затем добавляли необходимые наполнители к DS материалу.

Последовательность добавления ингредиентов к DS раствору была следующей.

Добавляли D-маннит или дигидрат трегалозы, перемешивали до полного растворения, добавляли полоксамер 188 или полисорбат 20 (20 мг/мл маточный раствор), перемешивали до полного растворения, добавляли L-метионин и перемешивали до полного растворения (только для сравнительного препарата), перемешивали до полного растворения, проверяли pH и доводили до целевого с помощью гидроксида

натрия или разведенной уксусной кислоты. Растворы взвешивали, доводя до целевого с помощью релевантного буфера, таким образом, чтобы получить DP композиции, перечисленные в табл. 7. DP растворы заполняли (8 мл) в DIN6R флаконы.

3.2. Термический стресс.

3.2.1. Содержание белка.

Не наблюдали изменений в содержании белка (OD, Lambda 35, Perkin Elmer) в течение 4 недель при 40°C (табл. 7) и 8 недель при 25°C (табл. 8).

Таблица 7

Содержание белка (мг/мл) согласно ОП DoE2 препаратов (термический стресс при 40°C)

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Время 0	2 недели (40°C)	4 недели (40°C)
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	22,3	20,0	20,9
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	22,0	20,6	21,6
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	21,9	20,5	21,6
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	22,1	20,5	22,3
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	21,7	20,7	22,8
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	22,7	21,3	22,5
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	21,5	20,5	23,5
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	21,5	20,4	23,3

Таблица 8

Содержание белка (мг/мл) согласно ОП DoE2 препаратов (термический стресс при 25°C)

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Время 0	8 недель (25°C)
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	22,3	20,6
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	22,0	21,0
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	21,9	21,3
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	22,1	21,5
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	21,7	20,5
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	22,7	21,0
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	21,5	21,1
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	21,5	21,2

3.2.2. Суммарные агрегаты.

Суммарные агрегаты, определенные согласно эксклюзионной ВЭЖХ для стабильности при 40°C и 25°C, представлены на фиг. 6 и 7 соответственно. Наблюдали только незначительные, несущественные изменения агрегации.

3.2.3. Фрагментация с помощью Bioanalyzer.

Фрагменты оценивали в течение 1 месяца при 40°C и через 2 месяца при 25°C. Релевантные результаты представлены на фиг. 8 и 9 соответственно. При 40°C за исключением препарата DoE2-1, в котором присутствовало количество фрагментов выше 7% через 1 месяц, для других формул наблюдали сходное поведение (4-6% для фрагментов через 1 месяц) с незначительно лучшим поведением препаратов DoE2-4, DoE2-5 и DoE2-6 (4,0-4,5% для фрагментов через 1 месяц при 40°C).

При 25°C сходные проценты фрагментации были обнаружены через 2 месяца (4,6-6,1%).

3.2.4. Профиль изоформ.

Профиль изоформ согласно iCE280 (Fast IEF Analyzer, Convergent Bioscience) для DoE2 препаратов определяли во время 0 и через 4 недели хранения при 40°C. При хранении при 40°C можно определить типичное повышение кислого кластера, в то время как наблюдали одновременное снижение щелочных изоформ.

Профили изоформ оценивали в течение 1 месяца при 40°C (табл. 9) и через 8 недель при 25°C (фиг. 10).

Сопоставимые изменения наблюдали во всех образцах в обоих стрессовых условиях.

Таблица 9

iCE280 результаты для DoE2 препаратов через 4 недели при 40°C

	Время 0			4 недели при 40°C		
	Кислотные формы (%)	Основной пик (%)	Щелочные формы (%)	Кислотные формы (%)	Основной пик (%)	Щелочные формы (%)
DoE2 - 1	32,3	36,0	31,7	40,3	31,9	27,8
DoE2 - 2	32,0	37,7	30,4	38,0	33,6	28,5
DoE2 - 3	32,2	36,7	31,1	39,9	32,7	27,5
DoE2 - 4	32,7	36,7	30,6	39,7	33,0	27,3
DoE2 - 5	32,5	37,4	30,2	38,1	33,4	28,5
DoE2 - 6	32,4	37,0	30,7	38,3	33,7	28,0
DoE1 - 8	33,2	36,9	30,0	38,8	33,5	27,7
Сравнение	32,2	36,2	31,7	37,7	33,4	28,9

3.2.6. Мутность.

Не наблюдали изменений через 1 месяц при 40°C (табл. 8) и 2 месяца при 25°C (табл. 9).

Таблица 10

Мутность DoE2 препаратов через 1 месяц при 40°C

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Время 0	2 недели (40°C)	4 недели (40°C)
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	2	2	2
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	2	2	2
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2	2
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2	2
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	2	2	2
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	2	2	2
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2	2
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	3	3	2

Таблица 11

Мутность DoE2 препаратов через 2 месяца при 25°C

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Время 0	8 недель (25°C)
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	2	2
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	2	2
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	2	2
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	2	2
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	3
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	3	3

3.2.7. pH.

Не наблюдали изменений через 1 месяц при 40°C (табл. 12) и 2 месяца при 25°C (табл. 13).

Таблица 12

pH DoE2 препаратов через 1 месяц при 40°C

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Время 0	2 недели (40°C)	4 недели (40°C)
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	5,2	5,2	5,2
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	5,2	5,2	5,2
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2	5,2
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2	5,2
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2	5,2
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2	5,2
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,5	5,5	5,5
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,5	5,5	5,5

Таблица 13

pH DoE2 препаратов через 2 месяца при 25°C

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Время 0	8 недель (25°C)
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	5,2	5,2
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	5,2	5,2
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,2	5,3
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,5	5,5
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,5	5,6

3.2.8. Круговой дихроизм.

CD спектры (J-810 Spectropolarimeter, Jasco) DoE2 препаратов собирали во время 0 и через 4 недели при 40°C и 8 недель при 25°C в ближнем УФ-диапазоне.

Белок во всех препаратах в целом сохранял свою третичную структуру через 4 недели при 40°C и 8 недель при 25°C.

3.2.9. Частицы, невидимые невооруженным глазом.

Определяли частицы, невидимые невооруженным глазом, в DoE2 препаратах через 8 недель хранения при 2-8°C. Результаты представлены в табл. 14. Было обнаружено, что значения находятся в пределах допустимых интервалов Европейской Фармакопеи (для растворов, поставляемых в контейнерах, с номинальным содержанием менее чем 100 мл).

Таблица 14

Частицы, невидимые невооруженным глазом, DoE2 препаратов через 8 недель при 2-8°C

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Частицы, невидимые невооружённым глазом > 10 мкм (на контейнер)	Частицы, невидимые невооружённым глазом > 25 мкм (на контейнер)
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат рН 5,2	D-Маннит	Нет	754	33
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат рН 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	716	14
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат рН 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	597	24
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат рН 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1839	100
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат рН 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	431	38
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат рН 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	521	28
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат рН 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	915	14
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат рН 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1873	52

3.3. Механический стресс.

3.3.1. Фрагментация с помощью Bioanalyzer.

Через 24 ч при 300 об/мин наблюдали незначительные изменения для фрагментов (табл. 15) во всех образцах (вплоть до 5,0-6,5%) с отсутствием специфической взаимосвязи с тестируемыми специфическими композициями.

Таблица 15

Фрагменты (%) с помощью Bioanalyzer для DoE2 препаратов после встряхивания в течение 24 ч (300 об/мин; комнатная температура)

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно-активное вещество	Время 0	24 ч 300 об./мин
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат рН 5,2	D-Маннит	Нет	4,9	5,5
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат рН 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	4,6	5,0
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат рН 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	4,7	5,7
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат рН 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	4,6	6,5
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат рН 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,1	6,2
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат рН 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,2	5,3
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат рН 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	3,5	5,4
8	Сравнение	20	10 мМ ацетат рН 5,5	D-Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	3,4	5,4

3.3.2. Агрегаты.

Не наблюдали изменений после механического встряхивания (табл. 16).

Таблица 16

Агрегаты (%) согласно эксклюзионной ВЭЖХ DoE2 препаратов
после встряхивания в течение 24 ч (300 об/мин; комнатная температура)

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно- активное вещество	Вре- мя 0	24 ч 300 об./мин
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	1,5	1,5
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	1,5	1,5
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1,6	1,5
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1,6	1,5
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	1,6	1,5
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	1,6	1,6
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1,6	1,6
8	Срав- нение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L- Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1,6	1,6

3.3.3. pH.

Не наблюдали изменений после механического встряхивания (табл. 17).

Таблица 17

pH DoE2 препаратов после встряхивания в течение 24 ч (300 об/мин; комнатная температура)

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно- активное вещество	Вре- мя 0	24 ч 300 об./мин
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	5,2	5,2
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	5,2	5,2
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	5,2	5,2
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,5	5,5
8	Срав- нение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L- Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	5,5	5,5

3.4. Мутность.

Не наблюдали изменений после механического встряхивания (табл. 18).

Таблица 18

Мутность (NTU) DoE2 препаратов после встряхивания
в течение 24 ч (300 об/мин; комнатная температура)

№	ИД	Конц. белка (мг/мл)	Буфер	Наполнитель (280 мМ)	Поверхностно- активное вещество	Время 0	24 ч 300об./ мин
1	DoE2 - 1	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Нет	2	2
2	DoE2 - 2	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Нет	2	2
3	DoE2 - 3	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2
4	DoE2 - 4	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2
5	DoE2 - 5	20	10 мМ ацетат pH 5,2	D-Маннит	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	2	2
6	DoE2 - 6	20	10 мМ ацетат pH 5,2	Дигидрат трегалозы	Lutrol F-68 (0,5 мг/мл)	2	2
7	DoE1 - 8	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2	2
8	Срав- нение	20	10 мМ ацетат pH 5,5	D-Маннит + L- Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	3	2

3.5. DoE2: выводы.

Результаты свидетельствуют о том, что при pH 5,2 (экстраполированный из DoE1) не оказывает влияния на фрагментацию и, следовательно, подходящий для применения в стабильном препарате. Показано, что оптимальное pH для сохранения стабильности белка находится в диапазоне 5,0-5,5 (DoE1). В отличие от этого значения pH 5,6-5,7 могут приводить к более высокой фрагментации.

Маннит и дигидрат трегалозы приводят к сходному поведению. Не было обнаружено преимуществ полоксамера 188 по сравнению с твином 20. Эти результаты также свидетельствуют о том, что более высокая концентрация белка (20 мг/мл) в DoE2 препарате практически осуществима при отсутствии ограничения для наблюдаемой или предполагаемой стабильности.

DoE2. Препарат 3 (формула наиболее предпочтительная и в конечном итоге выбрана для дальнейшего применения при 20 мг/мл) сравнивали относительно профилей изоформ со сравнительной формулой во время 0 через 4 недели при 40°C и 8 недель при 25°C для оценки, будет ли наблюдаться различное поведение для двух формул относительно времени стабильности при различных условиях. Результаты представлены в табл. 19.

Таблица 19

Профили изоформ согласно iCE280 для DoE2 препарата 3 и сравнительного препарата во время 0 через 4 недели (40°C) и 8 недель (25°C)

№ ИД	Буфер	pH	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество	Класс-тер	Время 0	4 недели (40°C)	8 недель (25°C)
DoE2 - 3	10 mM Ацетат	5,20	D-Маннит	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1	1,6	3,1	2,9
					2	4,5	5,3	7,1
					3	9,9	10,8	9,1
					4	16,2	20,7	18,0
					5	36,7	32,7	34,9
					6	22,2	19,7	20,3
					7	8,9	7,8	7,7
Сравнение	10 mM Ацетат	5,50	Маннит + L-Метионин	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1	1,8	2,3	3,4
					2	4,3	5,0	8,1
					3	9,8	10,6	10,0
					4	16,3	19,8	16,9
					5	36,2	33,4	34,7
					6	22,6	21,1	19,6
					7	9,1	7,8	7,4

Также была проиллюстрирована дополнительная временная точка (8 недель) при 25°C без серьезных проблем, возникающих вследствие уменьшенного pH по сравнению со сравнительным препаратом.

Пример 4. Влияние антиоксиданта (X-метионин).

Так как метионин используется в препарате, описанном в WO 2013079174, разработка заявляемого в данной заявке препарат авелумаба нацелена также на выяснение влияния этого соединения в качестве антиоксиданта.

Образцы 10 мг/мл (из партии DoE1) 2-кратно разводили с помощью 200 мкл 6% H₂O₂, получая конечную концентрацию белка приблизительно 5 мг/мл и 3% H₂O₂, и затем инкубировали 3 ч при 5°C. После окончания инкубирования, образец промывали против воды путем ультрацентрифугирования, используя Amicon Ultra (Millipore) 4 мл 10 кДа (4 промывки по 1 мл каждая стадия). Конечная концентрация белка после обработки Amicon составляла приблизительно 10 мг/мл.

DoE1. Препарат 8 был идентичным сравнительной формуле DoE2, за исключением присутствия L-метионина: принудительное окисление с помощью H₂O₂ (3 ч при 2-8°C) двух формул и последующее тестирование согласно iCE280 (окисление в целом приводит к повышению более кислых видов на электрофореграммах) и целью Bioanalyzer было определение, будут ли наблюдаться какие-либо различия в двух препаратах благодаря присутствию антиоксидантного агента. Результаты представлены в табл. 20 и 21.

Профили изоформ согласно iCE280 DoE1 препарата 8 и
сравнительного препарата после обработки с принудительным окислением

№ ИД	Буфер	pH	Анти PD-L1 (мг/мл)	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество	Класс-тер	Окисленное с помощью 3% H ₂ O ₂ (через 10 недель хранения при 2-8°C)
DoE1 - 8	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1	2,2
						2	4,5
						3	9,8
						4	23,2
						5	39,0
						6	16,6
						7	4,8
Сравнение	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ) + L-Метионин (1,4 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1	2,2
						2	4,5
						3	10,1
						4	23,7
						5	37,9
						6	16,8
						7	4,8

№ ИД	Буфер	pH	Анти PD-L1 (мг/мл)	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество	Класс-тер	Окисление с помощью 3% H ₂ O ₂ (через 4 недели хранения при 40°C + 6 недель при 2-8°C)
DoE1 - 8	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1	2,5
						2	5,9
						3	11,4
						4	27,2
						5	34,5
						6	14,6
						7	4,0
Сравнение	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ) + L-Метионин (1,4 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	1	2,7
						2	5,9
						3	11,1
						4	26,7
						5	35,8
						6	14,4
						7	3,4

Верхняя часть таблицы: образцы хранили при 2-8°C.

Нижняя часть таблицы: образцы хранили 4 недели при 40°C+6 недель при 2-8°C.

Сравнительное обилие кислых кластеров наблюдали для двух препаратов (с метионином или без него).

Также фрагменты тестировали с помощью Bioanalyzer для этих образцов (табл. 21): сопоставимые уровни фрагментации наблюдали для двух препаратов (с метионином или без него).

Таблица 21

Фрагменты с помощью Bioanalyzer DoE1 препарата 8 и сравнительного препарата после обработки с принудительным окислением

№ ИД	Буфер	pH	Анти PD-L1 (мг/мл)	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество	Окисление с помощью 3% H ₂ O ₂ (через 10 недель хранения при 2-8°C)
DoE1 - 8	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2,4
Сравнение	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ) + L-Метионин (1,4 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2,5

№ ИД	Буфер	pH	Анти PD-L1 (мг/мл)	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество	Окисленное с помощью 3% H ₂ O ₂ (через 4 недели хранения при 40°C + 6 недель при 2-8°C)
DoE1 - 8	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	2,5
Сравнение	10 мМ Ацетат	5,50	10	Маннит (280 мМ) + L-Метионин (1,4 мМ)	Твин 20 (0,5 мг/мл)	3,0

Верхняя часть таблицы: образцы хранили при 2-8°C.

Нижняя часть таблицы: образцы хранили 4 недели при 40°C+6 недель при 2-8°C.

Эти результаты свидетельствуют о том, что антиоксидант не является необходимым для стабилизации авелумаба и, следовательно, может быть исключен из препарата.

Пример 5. Исследования долгосрочной стабильности.

5.1. Состав и эффективность лекарственного продукта.

Были приготовлены препараты авелумаба 1, 2, 3, 4 и 5, перечисленные в табл. 22, и они использовались для исследований долгосрочной стабильности. Процесс приготовления включал получение смеси с последующей стадией стерилизации путем двойной фильтрации через мембрану 0,22 мкм (тестировали PES и PVDF фильтры) перед конечным заполнением во флаконы. Препарат 5 соответствует сравнительному образцу, также используемому в DoE-1 и -2 исследованиях, как описано в примере 2 и 3.

Таблица 22

DP композиции

Ингредиент (ы)	DP Композиции				
	Препарат 1 (DP 01-190214)	Препарат 2 (DP 02-190214)	Препарат 3 (DP 03-180214)	Препарат 4 (DP 04-180214)	Сравнение (DP 05-190214)
Авелумаб	20 мг/мл	20 мг/мл	10 мг/мл	10 мг/мл	10 мг/мл
Ацетат натрия буфер	10 мМ	10 мМ	10 мМ	10 мМ	10 мМ
Маннит	51 мг/мл	0 мг/мл	51 мг/мл	0 мг/мл	51 мг/мл
Дигидрат трегалозы	0 мг/мл	106 мг/мл	0 мг/мл	106 мг/мл	0 мг/мл
Полисорбат 20	0,5 мг/мл	0,5 мг/мл	0,5 мг/мл	0,5 мг/мл	0,5 мг/мл
L-Метионин	0	0	0	0	1,4 мМ
гидроксид натрия или соляная кислота	q.s до pH 5,2±0,1	q.s до pH 5,2±0,1	q.s до pH 5,2±0,1	q.s до pH 5,2±0,1	q.s до pH 5,5±0,1
Объем наполнения (в стеклянных флаконах I типа)	10 мл	10 мл	20 мл	20 мл	8 мл

При приготовлении (время 0) определяли осмолярность и было обнаружено, что она согласуется с предполагаемым значением (диапазон: 320-350 мОсм/кг).

5.2. Схема и продолжительность исследования стабильности.

Информация относительно стабильности препаратов, схемы исследования, условий хранения и используемых тестов обобщена в табл. 23. Для каждой временной точки в таблице указаны условия хранения, подлежащие тестированию.

Хранение образцов осуществляли во флаконах в вертикальном положении. Исследование осуществляли в течение 1 месяца при 40°C, 6 месяцев в условиях ускоренной деградации (при 25°C) и 12 месяцев в условиях длительного хранения (2-8°C).

Таблица 23

План стабильности

Тест	T=0	0,5 М (2 нед)	1 М (4 нед)	2 М (8 нед)	3 М (13 нед)	6 М (26 нед)	9М (39 нед)	12 М (52 нед)
Цвет	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C 5
Мутность	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C 10
pH	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
Содержание A280-A320	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
SE-ВЭЖХ	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C 15
SDS-page Red	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
SDS-page non- Red	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
iCE-280	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C 20
Осмолярность	X	40°C	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Невидимые частицы	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
Эффективность	X	40°C	25°C 40°C	Н/Д	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C 25

Данные собирали при 40°C (вплоть до 1 месяца), 25°C (вплоть до 6 месяцев) и 2-8°C (вплоть до 12 месяцев).

5.3. Стабильность при 2-8°C.

5.3.1. Степень интенсивности окраски путем визуальной проверки.

Не наблюдали изменений относительно стабильности. Все растворы оставались более прозрачными, чем самый прозрачный стандартный раствор (<Y7). Значения в пределах нормы.

5.3.2. Степень опалесценции согласно нефелометрии.

Все растворы проявляли мутность, находящуюся в диапазоне прозрачных растворов (1-3 NTU). Значения в пределах нормы.

5.3.3. pH.

Не наблюдали изменений относительно стабильности. Все растворы проявляли pH значения, соответствующие с целевым (5,2±0,1 для препаратов 1-4 и 5,5±0,1 для сравнительного DP). Значения в пределах нормы.

5.3.4. Содержание белка согласно ОП.

Концентрация препаратов 1 и 2 (целевая концентрация=20 мг/мл) была обнаружена в диапазоне 18,7-19,8 мг/мл (в пределах ±10 % лимитов по отношению к целевой) во время проведения исследования, в динамике не было существенных изменений.

Концентрация препаратов 3 и 4 и сравнение DP (целевая концентрация=10 мг/мл) была обнаружена в диапазоне 9,3-10,2 мг/мл во время проведения исследования; не было обнаружено существенных изменений.

Таким образом, содержание белка оставалось неизменным в течение 12 месяцев стабильности при 2-8°C (значения в пределах нормы).

5.3.5. Димеры и HMW согласно эксклюзионной ВЭЖХ.

Не наблюдали изменений агрегации в течение 12 месяцев при 2-8°C по отношению ко времени 0. Значения в пределах нормы.

5.3.6. Фрагменты (LMW) согласно SDS -PAGE N-Red.

Как показано на фиг. 11, образцы проявили для времени 0 значение LMW согласно SDS-PAGE N-RED в диапазоне 11,9-16,2% с последующим +5-7%-ным повышением в следующей точке (8 недель) и путем второстепенных изменений для остальной стабильности вплоть до 6 месяцев.

5.3.7. Частицы, невидимые невооруженным глазом.

Как для частиц, невидимых невооруженным глазом на контейнер, количество было ниже пределов, установленных Фармакопеями США, Европы и Японии, для растворов для инфузии или инъекции с номинальным содержанием менее чем 100 мл (6000 на контейнер, равное или больше чем 10 мкм, и 600 на контейнер, равное или больше чем 25 мкм). Релевантные столбиковые диаграммы для двух диапазонов размеров частиц представлены на фиг. 12 и 13 соответственно для частиц, невидимых невооруженным глазом ≥ 10 мкм, и частиц, невидимых невооруженным глазом ≥ 25 мкм.

Не было обнаружено изменений для частиц, невидимых невооруженным глазом при хранении.

5.3.8. Биологическая активность.

Значения биологической активности типично находились в диапазоне 89-110% для всех временных точек, тестируемых во время исследования стабильности. Не наблюдали снижения при хранении.

5.3.9. Характер изоформ.

Результаты с iCE280 экспериментов представлены на фиг. 14 (кислый кластер, сумма пиков 1-2-3-4), фиг. 15 (основной пик) и фиг. 16 (щелочной кластер, сумма пиков 6-7). Профиль изоформ хранили в течение 12-месячного периода стабильности. В охлажденных состояниях не наблюдали влияния pH на изоформы антитела.

5.3.10. Выводы относительно стабильности при 2-8°C.

Было обнаружено, что ни одна из физико-химических свойств пяти тестируемых препаратов не подвергается существенным изменениям в течение 12-месячной стабильности при 2-8°C. Это является неожиданным в особенности для характера изоформ, как в препаратах 1-4, где отсутствует метионин.

5.4. Стабильность при 25°C.

5.4.1. Степень интенсивности окраски путем визуальной проверки.

Не наблюдали изменений относительно стабильности. Все растворы оставались более прозрачными, чем самый прозрачный стандартный раствор ($< Y7$). Значения в пределах нормы.

5.4.2. Степень опалесценции согласно нефелометрии.

Все растворы проявляли мутность, находящуюся в интервале 1-3 NTU (диапазон прозрачных растворов). Значения в пределах нормы.

5.4.3. pH.

Не наблюдали изменений относительно стабильности. Все растворы проявляли pH значения, согласующиеся с целевым ($5,2 \pm 0,1$ для препаратов 1-2-3-4 и $5,5 \pm 0,1$ для сравнительного DP). Значения в пределах нормы.

5.4.4. Содержание белка согласно ОП.

Концентрация препаратов 1 и 2 (целевая концентрация=20 мг/мл) была обнаружена в диапазоне 18,5-20,0 мг/мл (в пределах $\pm 10\%$ лимитов по отношению к целевой) во время проведения исследования, в динамике не было существенных изменений.

Концентрация препаратов 3 и 4 и сравнительного DP (целевая концентрация=10 мг/мл) была обнаружена в диапазоне 9,5-10,0 мг/мл во время проведения исследования; не было обнаружено существенных изменений.

Таким образом, содержание белка оставалось неизменным в течение шестимесячной стабильности при 25°C. Значения в пределах нормы.

5.4.5. Димеры и HMW согласно эксклюзионной ВЭЖХ.

Не наблюдали изменений агрегации в течение 6 месяцев при 25°C по отношению ко времени 0. Во время осуществления исследования было обнаружено, что агрегация была ниже допустимого предела (не более чем 5%).

5.4.6. Фрагменты (LMW) согласно SDS-PAGE N-Red.

Образцы проявили для времени 0 значение LMW согласно SDS-PAGE N-RED в диапазоне 11,9-16,2% с последующим поэтапным повышением в следующей точке (4 недели), затем путем второстепенных изменений для остальной стабильности вплоть до 6 месяцев (фиг. 17).

5.4.7. Частицы, невидимые невооруженным глазом.

Как для частиц, невидимых невооруженным глазом на контейнер, количество было ниже пределов, установленных Фармакопеями США, Европы и Японии, для растворов для инфузии или инъекции с номинальным содержанием менее чем 100 мл (6000 на контейнер, равное или больше чем 10 мкм, и 600 на контейнер, равное или больше чем 25 мкм). Релевантные столбцы-диаграммы представлены на фиг. 18 и 19.

Не наблюдали изменений для частиц, невидимых невооруженным глазом, относительно стабильности при 25°C.

5.4.8. Биологическая активность.

Значения биологической активности типично находились в диапазоне 90-110% для всех временных точек, тестируемых во время исследования стабильности. Не наблюдали снижения относительно стабильности при 25°C.

5.4.9. Характер изоформ.

Результаты с iCE280 экспериментов представлены на фиг. 20 (кислый кластер, сумма пиков 1-2-3-4),

фиг. 21 (основной пик) и фиг. 22 (щелочной кластер, сумма пиков 6-7).

Кислый кластер имеет тенденцию к повышению при хранении при 25°C. Все образцы проявили повышение кислого кластера приблизительно на +10% через 6 месяцев при 25°C и сопутствующее снижение основного пика (- 5% через 6 месяцев) и щелочного кластера (-5% через 6 месяцев).

5.4.10. Выводы относительно стабильности при 25°C.

В течение 6-месячной стабильности при 25°C пять тестируемых препаратов не проявили изменений относительно содержания белка, внешнего вида, прозрачности, pH, агрегатов, частиц, невидимых невооруженным глазом, и биоактивности по отношению ко времени 0.

Было обнаружено, что фрагменты повышались на +5%-ных точек в соответствии с SDS-PAGE N-RED через 6 месяцев при 25°C, в то время как не было обнаружено статистически достоверных изменений с помощью Bioanalyzer.

Сходное поведение для профиля изоформ согласно iCE280. Кислый кластер во всех препаратах проявлял тенденцию к повышению на +10% в течение 6 месяцев исследования с конкурентным снижением основного пика и щелочного кластера.

5.5. Стабильность при 40°C.

5.5.1. Степень интенсивности окраски путем визуальной проверки.

Не наблюдали изменений относительно стабильности. Все растворы оставались более прозрачными, чем самый прозрачный стандартный раствор (<Y7).

5.5.2. Степень опалесценции согласно нефелометрии.

Не наблюдали изменений относительно стабильности. Все растворы проявляли мутность, включающую 2 NTU (диапазон прозрачных растворов). Значения в пределах нормы.

5.5.3. pH.

Не наблюдали изменений относительно стабильности. Все растворы проявляли pH значения, соответствующие с целевым (5,2±0,1 для препаратов 1-2-3-4 и 5,5±0,1 для сравнительного DP). Значения в пределах нормы.

5.5.4. Содержание белка согласно ОП.

Концентрация препаратов 1 и 2 (целевая концентрация=20 мг/мл) была обнаружена в диапазоне 18,0-19,0 мг/мл (в пределах ±10 % лимитов по отношению к целевой) во время проведения исследования с отсутствием тенденции потери белка в динамике.

Концентрация препаратов 3 и 4 и сравнение DP (целевая концентрация=10 мг/мл) была обнаружена в диапазоне 9,5-10,0 мг/мл во время проведения исследования с отсутствием тенденции потери белка в динамике. Значения в пределах нормы.

В заключение тепловой стресс не является неблагоприятным для содержания белка в тестируемых условиях (вплоть до 1 месяца при 40°C).

5.5.5. Димеры и HMW согласно эксклюзионной ВЭЖХ.

Не было обнаружено значительных изменений агрегации через 1 месяц. Все значения ниже 1% суммарных агрегатов через 1 месяц (ниже допустимых пределов, которые составляют не более 5%).

5.5.6. Фрагменты (LMW) согласно SDS-PAGE N-Red, Bioanalyzer.

Учитывая изменчивость метода SDS-PAGE N-RED (например, значения для времени 0 11,9 и 14,5 определяли для DP 01-190214 и DP 02-190214 соответственно) можно сделать вывод о том, что не происходит существенных изменений во время проведения исследования при 40 °C (фиг. 23).

5.5.7. Частицы, невидимые невооруженным глазом.

Как для частиц, невидимых невооруженным глазом на контейнер, количество было ниже пределов, установленных Фармакопеями США, Европы и Японии для растворов для инфузии или инъекции с номинальным содержанием менее чем 100 мл (6000 на контейнер, равное или больше чем 10 мкм, и 600 на контейнер, равное или больше чем 25 мкм). Релевантные столбиковые диаграммы представлены на фиг. 24 и 25.

Не было обнаружено изменений частиц, невидимых невооруженным глазом, при термическом стрессе.

5.5.8. Биологическая активность.

Значения биологической активности типично находились в диапазоне 99-120 % для всех временных точек, тестируемых во время исследования стабильности. Не наблюдали снижения при термическом стрессе для образцов.

5.5.9. Характер изоформ.

Результаты с iCE280 экспериментов представлены на фиг. 26 (кислый кластер, сумма пиков 1-2-3-4), фиг. 27 (основной пик) и фиг. 28 (щелочной кластер, сумма пиков 6-7). Кислый кластер имеет тенденцию к повышению при хранении при 40°C.

Вариации основного пика подтверждали немного лучшую стабильность новых формул при 10 мг/мл и идентичное поведение для оставшихся композиций.

Результаты, полученные при определении щелочного кластера, подтверждают вышеописанные результаты.

Вплоть до двух недель сходное поведение наблюдали в пяти композициях. При более высоких временах стабильности незначительное различие возникает между 20 и 10 мг/мл авелумаб DP (немного более лучшая резистентность в формулах при 10 мг/мл).

5.5.10. Результат стабильности при 40°C.

При 40°C (1 месяц) пять тестируемых препаратов не проявили изменений относительно содержания белка, внешнего вида, прозрачности, pH, агрегаты, частицы, невидимые невооруженным глазом и биоактивность по отношению ко времени 0.

Незначительные различия между 10 и 20 мг/мл DP препаратами подтверждались согласно iCE280 (кислый кластер имел тенденцию немного повышаться при хранении незначительно более очевидно в 20 мг/мл DP препаратах по сравнению с 10 мг/мл DP препаратами).

5.6. Выводы.

5.6.1. Стабильность при 2-8°C (12 месяцев).

Было обнаружено, что все препараты являются стабильными: не наблюдается существенных изменений относительно внешнего вида, мутности (путем нефелометрии), частиц, невидимых невооруженным глазом, pH, содержания белка (путем ОП), агрегации (согласно эксклюзионной ВЭЖХ), фрагментов (путем SDS-PAGE N-RED и Bioanalyzer), профиля изоформ (согласно iCE280) и биологической активности (путем биоактивности) по отношению ко времени 0.

5.6.2. Стабильность при 25°C (6 месяцев).

Не наблюдали изменений содержания белка, внешнего вида, прозрачности, pH, агрегатов, частиц, невидимых невооруженным глазом, и биоактивности по отношению ко времени 0.

Было обнаружено, что фрагменты повышаются на +5% в соответствии с SDS-PAGE N-RED через 6 месяцев при 25°C, в то время как не было обнаружено статистически достоверных изменений с помощью Bioanalyzer (метод, используемый в качестве дополнительной методики для придания эксплуатационной надежности для выводов относительно проявления фрагментации).

Сходное поведение наблюдали для профиля изоформ согласно iCE280: кислый кластер во всех препаратах проявлял тенденцию к повышению на +10% в течение 6 месяцев исследования с конкурентным снижением основного пика и щелочного кластера.

5.6.3. Стабильность при 40°C (1 месяц).

Не наблюдали изменений относительно содержания белка, внешнего вида, прозрачности, pH, агрегатов, частиц, невидимых невооруженным глазом, и биоактивности по отношению ко времени 0.

Наблюдали незначительные различия между 10 и 20 мг/мл DP препаратами согласно iCE280 (кислый кластер имел тенденцию незначительно повышаться при хранении немного более очевидно в 20 мг/мл DP препаратах по сравнению с 10 мг/мл DP препаратами).

5.7. Стабильность в течение 24 месяцев.

5.7.1. Приготовление DP композиций.

Приготавливали следующие DP композиции и исследовали их стабильность в течение периода 24 месяцев.

Таблица 24

DP композиции

Ингредиент (ы)	DP Композиции	
	DP 01-160414	DP 02-160414
авелумаб	20 мг/мл	20 мг/мл
Ацетат Кислота ледяная (100%)	0,60 мг/мл *	0,60 мг/мл *
Маннит	51 мг/мл	51 мг/мл
Полисорбат 20	0,5 мг/мл	0,5 мг/мл
гидроксид натрия	0,30 мг/мл **	0,30 мг/мл **
Объем наполнения	10 мл	30 мл
Концентрация	200 мг/флакон	600 мг/флакон

* Соответствует 10 mM ацетата натрия.

** Конечная pH 5,2.

Оба препарата соответствовали препарату DP 01-190214, как показано в табл. 22. Незначительное отличие было только в том, что использовали фиксированное количество 0,3 мг/мл (7,5 mM) гидроксида натрия для получения pH 5,2 при комбинировании с 0,6 мг/мл ледяной уксусной кислоты. Единственное отличие между препаратами DP 01-160414 и DP 02-160414 состояло в том, что последний препарат имел объем 30 мл на флакон, в то время как первый имел объем 10 мл на флакон.

Оба препарата дважды фильтровали через 0,22 мкм PVDF мембрану, после этого вручную заполняли во флаконы. Содержание белка тестировали перед и после фильтрации; релевантные результаты указывали на то, что отсутствует потеря белка при двойной асептической фильтрации.

Собирали данные стабильности вплоть до 24 месяцев (при +5±3°C) и вплоть до 6 месяцев при +25°C

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ОВ $60 \pm 5\%$) для двух препаратов в соответствующих конечных контейнерах (флаконах).

5.7.2. Стабильность вплоть до 24 месяцев (при $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

При $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ вплоть до 24 месяцев не наблюдали изменений относительно содержания белка (путем ОП), НМВ (согласно эксклюзионной ВЭЖХ), мутности (путем нефелометрии), образования частиц (путем светоблокировки), степени окрашивания (путем визуального осмотра), и биоэффективности. Незначительно повышались кислые изоформы ($+5\%$ наблюдали для всех композиций через 2 года).

Не наблюдали статистически достоверных изменений относительно фрагментации согласно SDS-PAGE N-RED, Bioanalyzer и CE-SDS N-RED.

5.7.3. Стабильность вплоть до 6 месяцев при $+25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ОВ $60 \pm 5\%$).

При $+25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ОВ $60 \pm 5\%$) вплоть до 6 месяцев не наблюдали изменений относительно содержания белка (путем ОП), НМВ (согласно эксклюзионной ВЭЖХ), мутности (путем нефелометрии), образования частиц (путем светоблокировки), профиль изоформ (согласно iCE280), степени окрашивания (путем визуального осмотра), электрофоретической чистоты (путем SDS/-PAGE RED) и биоэффективности. Подобно стабильности при 5°C не наблюдали статистически достоверного повышения фрагментации при $+25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ОВ $60 \pm 5\%$) (результаты подтверждены с помощью Bioanalyzer).

5.7.4. Время удерживания.

Время удерживания перед фильтрацией (в контейнерах вплоть до 24 ч при комнатных температурах), время удерживания после фильтрации (в контейнерах вплоть до 72 ч при комнатная температура) и встряхивания (вплоть до 24 ч при 200 об/мин при комнатной температуре) показало отсутствие существенных изменений содержания белка, образования частиц, агрегатов и мутности, таким образом указывая на отсутствие основных проблем, которые могут возникать при нормативных продолжительностях операций, типично происходящих при процессе приготовления.

5.7.5. Исследование замораживания/оттаивания.

Исследование замораживания/оттаивания свидетельствовало о том, что тестируемые препараты безопасно могут быть заморожены при -80°C , и затем им предоставляют возможность нагреться вплоть до $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ или $+25^{\circ}\text{C}$ с отсутствием существенных изменений, происходящих с белком.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный фармацевтический препарат антитела, который содержит
 - (I) авелумаб в концентрации от 1 до 30 мг/мл в качестве антитела;
 - (II) уксусную кислоту, или ацетат, или гистидин в концентрации от 5 до 15 мМ в качестве буферного агента;
 - (III) D-маннит или трегалозу в концентрации от 240 до 320 мМ либо комбинацию аргинина HCl в концентрации от 50 до 150 мМ и глутаминовой кислоты в концентрации от 25 до 75 мМ в качестве стабилизатора,
 где препарат не содержит антиоксиданта и имеет pH от 5,0 до 6,0.
2. Препарат по п.1, где pH равно от 5,0 до 5,6.
3. Препарат по п.1 или 2, где концентрация авелумаба составляет от 10 до 20 мг/мл.
4. Препарат по любому из пп.1-3, где концентрация ацетата или гистидина составляет 10 мМ.
5. Препарат по любому из пп.1-3, где концентрация D-маннита или трегалозы составляет 280 мМ или для комбинации аргинина HCl и глутаминовой кислоты концентрация аргинина HCl составляет 150 мМ, а концентрация глутаминовой кислоты составляет 50 мМ.
6. Препарат по любому из пп.1-5, который дополнительно содержит полоксамер 188 или полисорбат 20 в концентрации от 0,25 до 0,75 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества.
7. Препарат по п.6, где концентрация полоксамера 188 или полисорбата 20 составляет 0,5 мг/мл.
8. Препарат по любому из пп.1-7, где pH равно от 5,2 ($\pm 0,1$) до 5,5 ($\pm 0,1$).
9. Препарат по любому из пп.1-8, который содержит ацетат в концентрации 10 мМ.
10. Препарат по любому из пп.1-9, который содержит D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ.
11. Препарат по любому из пп.6-10, который содержит полисорбат 20 или полоксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл и имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).
12. Препарат по п.6, который содержит
 - (I) авелумаб в концентрации 10 мг/мл;
 - (II) ацетат в концентрации 10 мМ;
 - (III) D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полисорбат 20 или полоксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл,
 где препарат имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).
13. Препарат по п.6, который состоит из
 - (I) авелумаба в концентрации 10 мг/мл;
 - (II) тригидрат ацетата натрия в концентрации 10 мМ;
 - (III) D-маннита или трегалозы в концентрации 280 мМ;

- (IV) полисорбата 20 или полоксамера 188 в концентрации 0,5 мг/мл; и дополнительно HCl для доведения pH, где препарат имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).
14. Препарат по п.6, который состоит из
- (I) авелумаба в концентрации 10 мг/мл;
 - (II) тригидрата ацетата натрия в концентрации 10 мМ;
 - (III) дигидрата трегалозы в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полисорбата 20 в концентрации 0,5 мг/мл; и дополнительно HCl для доведения pH, где препарат имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).
15. Препарат по п.6, который содержит
- (I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл в качестве антитела;
 - (II) уксусную кислоту или ацетат в концентрации 10 мМ в качестве буферного агента;
 - (III) D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ в качестве стабилизатора;
 - (IV) полисорбат 20 или полоксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества,
- где препарат имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).
16. Препарат по п.15, который содержит
- (I) авелумаб в концентрации 20 мг/мл;
 - (II) ацетат в концентрации 10 мМ;
 - (III) D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полисорбат 20 или полоксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл,
- где препарат имеет pH 5,5 ($\pm 0,1$).
17. Препарат по п.16, который состоит из
- (I) авелумаба в концентрации 20 мг/мл;
 - (II) уксусной кислоты в концентрации 10 мМ;
 - (III) D-маннита или дигидрата трегалозы в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полисорбата 20 или полоксамера 188 в концентрации 0,5 мг/мл; и дополнительно ацетата натрия для доведения pH, где препарат имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).
18. Препарат по п.17, который состоит из
- (I) авелумаба в концентрации 20 мг/мл;
 - (II) уксусной кислоты в концентрации 10 мМ;
 - (III) D-маннита в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полисорбата 20 в концентрации 0,5 мг/мл; и дополнительно ацетата натрия для доведения pH, где препарат имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).
19. Препарат по п.17, который состоит из
- (I) авелумаба в концентрации 20 мг/мл;
 - (II) уксусной кислоты в концентрации 10 мМ;
 - (III) дигидрата трегалозы в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полисорбата 20 в концентрации 0,5 мг/мл; и дополнительно ацетата натрия для доведения pH, где препарат имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).
20. Препарат по п.17, который состоит из
- (I) авелумаба в концентрации 20 мг/мл;
 - (II) уксусной кислоты в концентрации 10 мМ;
 - (III) D-маннита в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полоксамера 188 в концентрации 0,5 мг/мл; и дополнительно ацетата натрия для доведения pH, где препарат имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).
21. Препарат по п.17, который состоит из
- (I) авелумаба в концентрации 20 мг/мл;
 - (II) уксусной кислоты в концентрации 10 мМ;
 - (III) дигидрата трегалозы в концентрации 280 мМ;
 - (IV) полоксамера 188 в концентрации 0,5 мг/мл; и дополнительно ацетата натрия для доведения pH, где препарат имеет pH 5,2 ($\pm 0,1$).
22. Препарат по п.15, который состоит из
- (I) авелумаба в концентрации 20 мг/мл;
 - (II) уксусной кислоты в концентрации 10 мМ;

- (III) D-маннита в концентрации 280 мМ;
 (IV) полисорбата 20 в концентрации 0,5 мг/мл;
 и дополнительно гидроксида натрия в концентрации 7,5 мМ,
 где препарат имеет рН 5,2 ($\pm 0,1$).
23. Препарат по п.22, полученный в результате смешивания
 (I) 20 мг/мл авелумаба;
 (II) 0,6 мг/мл ледяной уксусной кислоты;
 (III) 51 мг/мл D-маннита;
 (IV) 0,5 мг/мл полисорбата 20;
 (V) 0,3 мг/мл гидроксида натрия; и
 воды (для инъекций) в качестве разбавителя.
24. Препарат по п.6, который состоит из
 (I) авелумаба в концентрации 20 мг/мл;
 (II) уксусной кислоты в концентрации 0,6 мг/мл;
 (III) D-маннита в концентрации 51 мг/мл;
 (IV) полисорбата 20 в концентрации 0,5 мг/мл;
 дополнительно гидроксида натрия в концентрации 0,3 мг/мл,
 где препарат имеет рН от 5,0 до 5,6.
25. Водный фармацевтический препарат антитела, который содержит
 (I) авелумаб в концентрации 10 мг/мл в качестве антитела;
 (II) ацетат в концентрации 10 мМ в качестве буферного агента;
 (III) D-маннит или трегалозу в концентрации 280 мМ в качестве стабилизатора;
 (IV) полисорбат 20 или полоксамер 188 в концентрации 0,5 мг/мл в качестве поверхностно-активного вещества,
 где препарат не содержит антиоксидант и имеет рН 5,5 ($\pm 0,1$).
26. Препарат по п.25, который состоит из
 (I) авелумаба в концентрации 10 мг/мл;
 (II) тригидрата ацетата натрия в концентрации 10 мМ;
 (III) D-маннита в концентрации 280 мМ;
 (IV) полисорбата 20 в концентрации 0,5 мг/мл; и
 дополнительно HCl для доведения рН,
 где препарат имеет рН 5,5 ($\pm 0,1$).
27. Водный фармацевтический препарат антитела, который состоит из
 авелумаба в концентрации 20 мг/мл в качестве активного компонента; и
 ледяной уксусной кислоты, D-маннита, полисорбата 20, гидроксида натрия, и
 имеет рН от 5,0 до 5,6, где препарат не содержит антиоксидант.
28. Препарат по п.27, который имеет рН 5,2 ($\pm 0,1$).
29. Препарат по любому из пп.1-28, где указанный авелумаб имеет последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2), а также последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 3, и несет гликозилирование на Asn300, который содержит FA2 и FA2G1 в качестве основных гликановых видов, имеющих соединенными общими >70% всех видов гликанов.
30. Препарат по п.29, где в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет общими 44-54% и указанный FA2G1 имеет общими 25-41% всех видов гликанов.
31. Препарат по п.30, где в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет общими 47-52% и указанный FA2G1 имеет общими 29-37% всех видов гликанов.
32. Препарат по п.31, где в гликозилировании авелумаба указанный FA2 имеет общими 49% и указанный FA2G1 имеет общими 30-35% всех видов гликанов.
33. Препарат по любому из пп.29-32, где гликозилирование авелумаба дополнительно содержит в качестве второстепенных видов гликанов A2 с общими <5%, A2G1 с общими <5%, A2G2 с общими <5% и FA2G2 с общими <7% всех видов гликанов.
34. Препарат по п.33, где в гликозилировании авелумаба указанный A2 имеет общими 3-5%, указанный A2G1 имеет общими <4%, указанный A2G2 имеет общими <3% и указанный FA2G2 имеет общими 5-6% всех видов гликанов.
35. Препарат по п.34, где в гликозилировании авелумаба указанный A2 имеет общими 3,5-4,5%, указанный A2G1 имеет общими 0,5-3,5%, указанный A2G2 имеет общими <2,5% и указанный FA2G2 имеет общими 5,5% всех видов гликанов.
36. Препарат по любому из пп.29-35, где указанный авелумаб имеет последовательность тяжелой цепи с (SEQ ID NO: 2).
37. Препарат по любому из пп.1-36, который предназначен для внутривенного (в/в) введения.
38. Способ лечения злокачественного новообразования, который включает введение препарата по любому из пп.1-37 пациенту.

39. Способ по п.38, где злокачественное новообразование выбирают из немелкоклеточного рака легких, уротелиальной карциномы, рака мочевого пузыря, мезотелиомы, карциномы клеток Меркеля, рака желудка или гастроэзофагеального перехода, рака яичников, рака молочной железы, тимомы, аденокарциномы желудка, адренокортикальной карциномы, плоскоклеточного рака области головы и шеи, почечно-клеточной карциномы, меланомы и/или классической лимфомы Ходжкина.

Последовательность тяжелой цепи Авелумаба - SEQ ID NO:1

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWSSIY
PSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTT
VDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Фиг. 1a

Последовательность тяжелой цепи Авелумаба, в которой отсутствует С-концевой К - SEQ ID NO:2

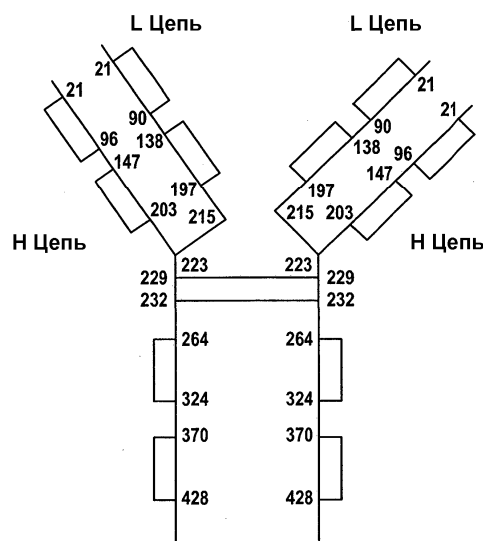
```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWSSIY
PSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTT
VDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```

Фиг. 1b

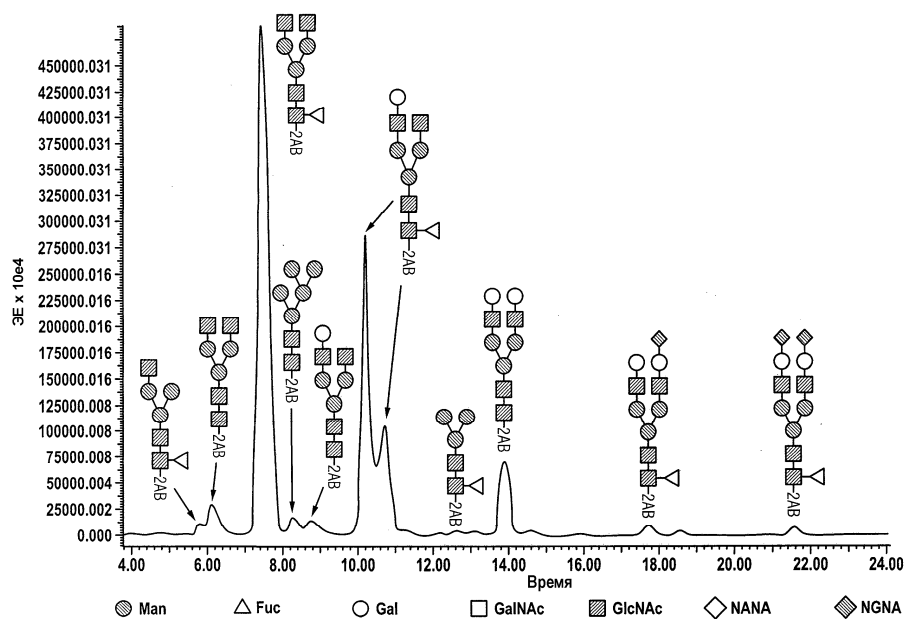
Последовательность легкой цепи Авелумаба -SEQ ID NO:3

```
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDY
VSNRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEADYYCSSYTSSSTRVFGTG
TKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGS
PVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECS
```

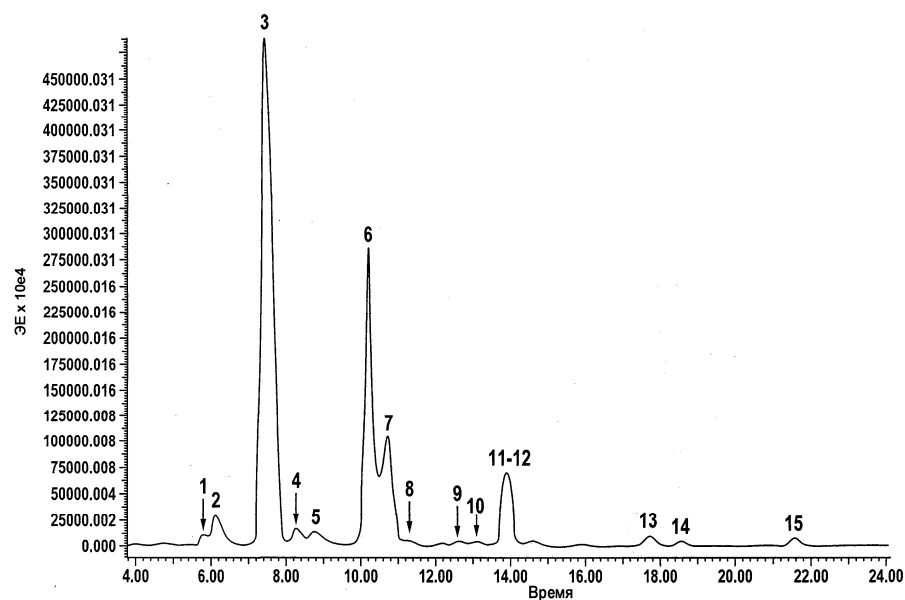
Фиг. 2



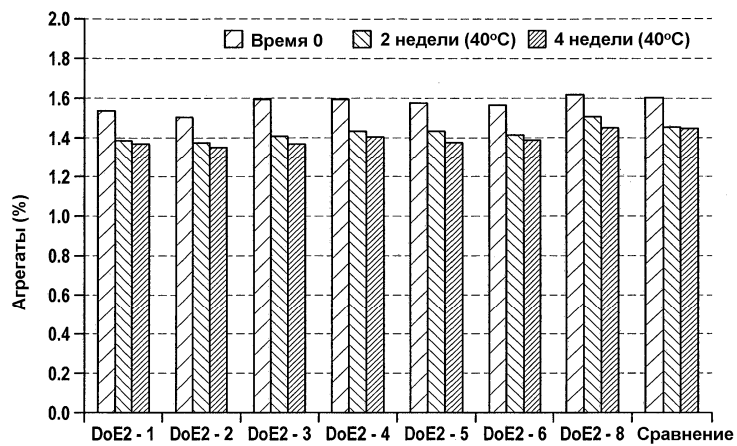
Фиг. 3



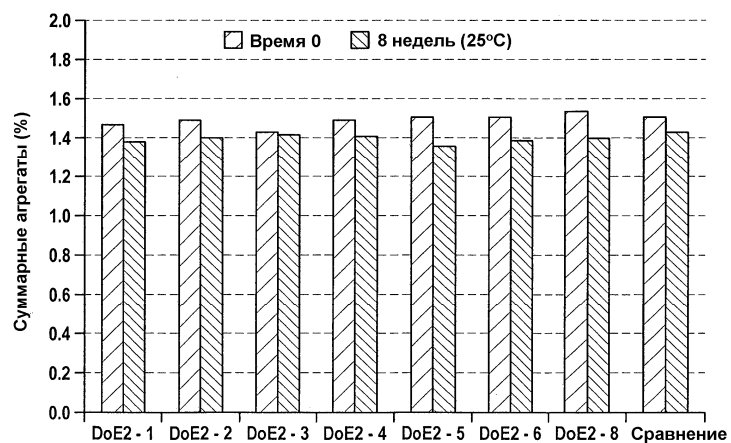
Фиг. 4



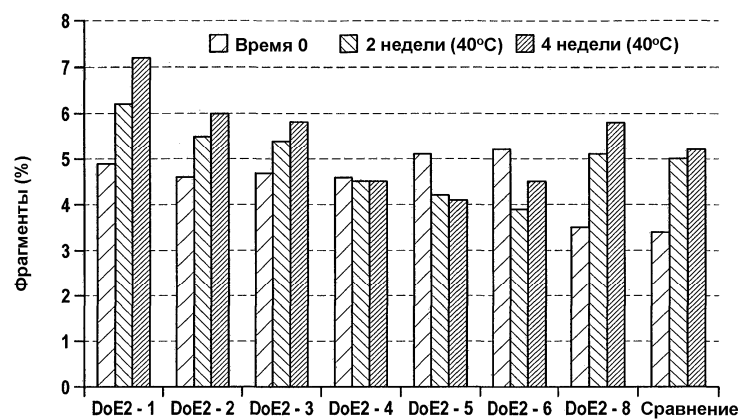
Фиг. 5



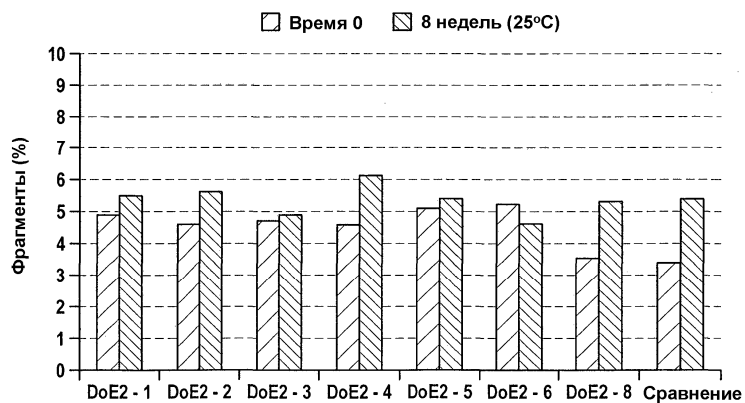
Фиг. 6



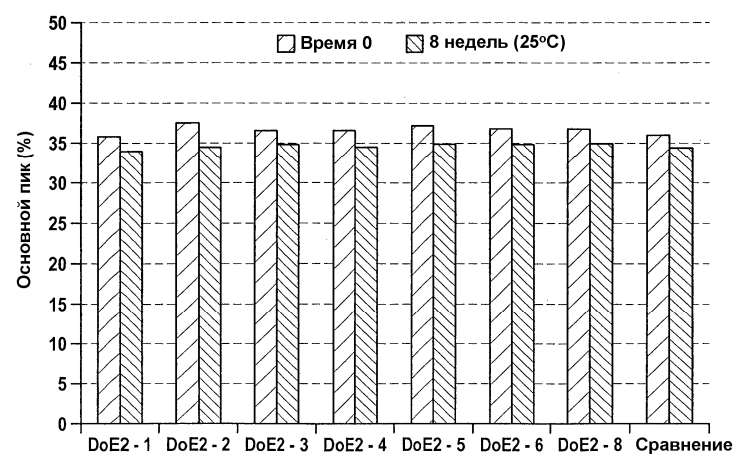
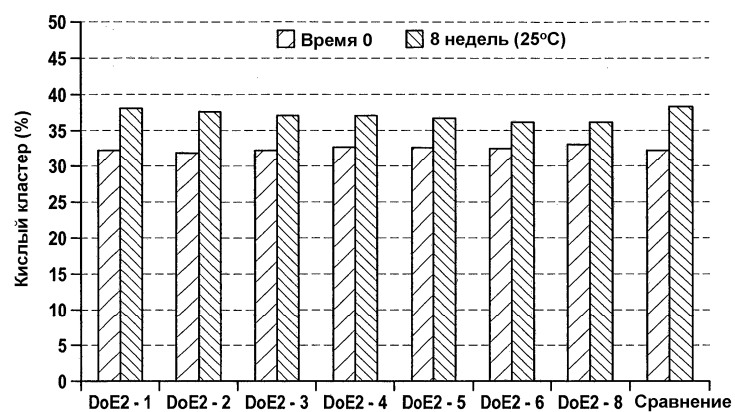
Фиг. 7



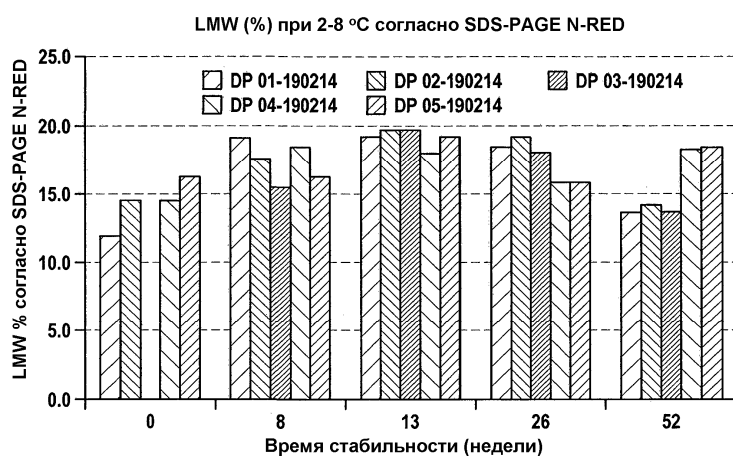
Фиг. 8



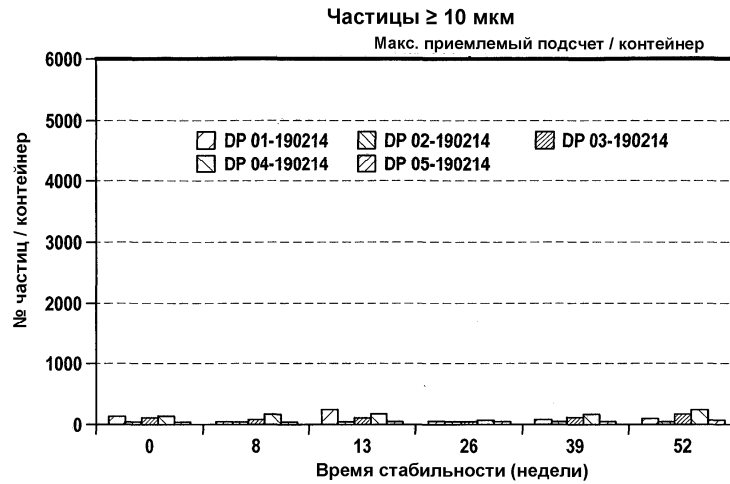
Фиг. 9



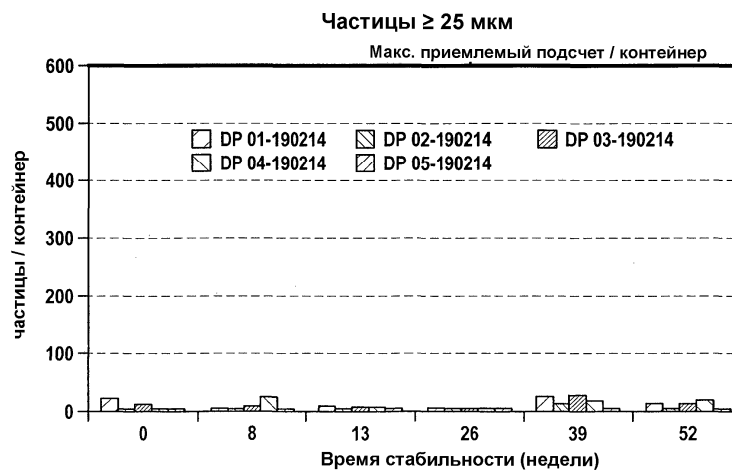
Фиг. 10



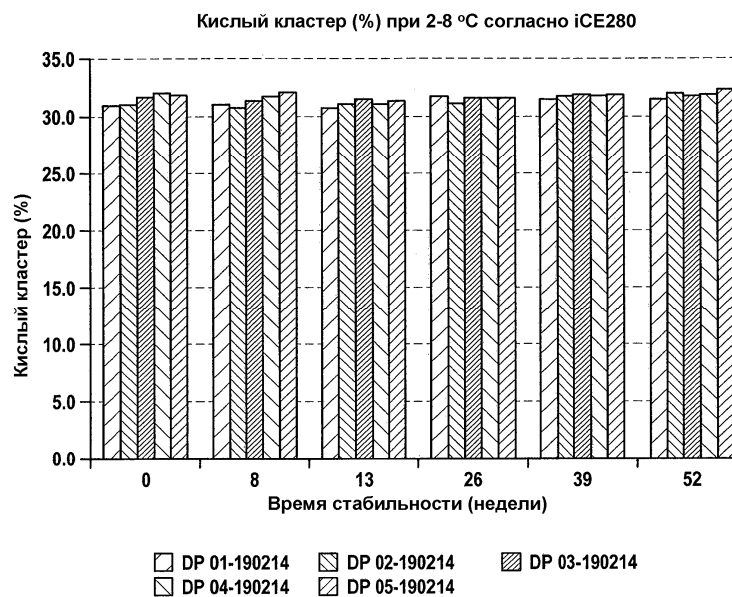
Фиг. 11



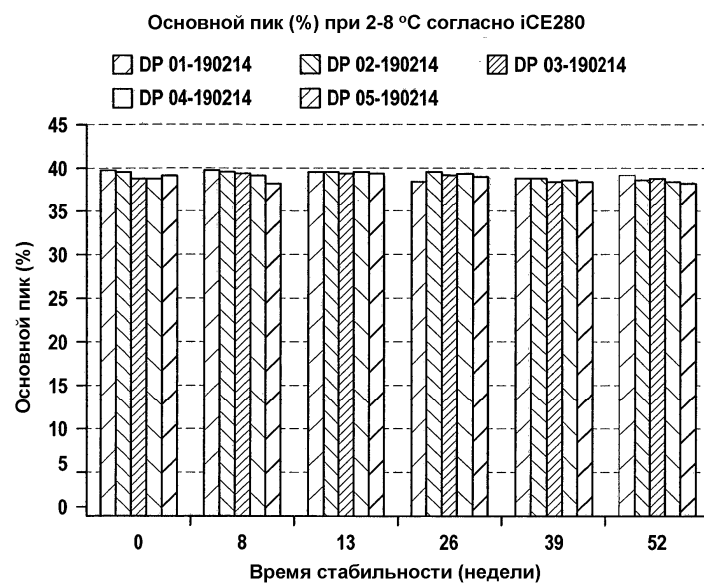
Фиг. 12



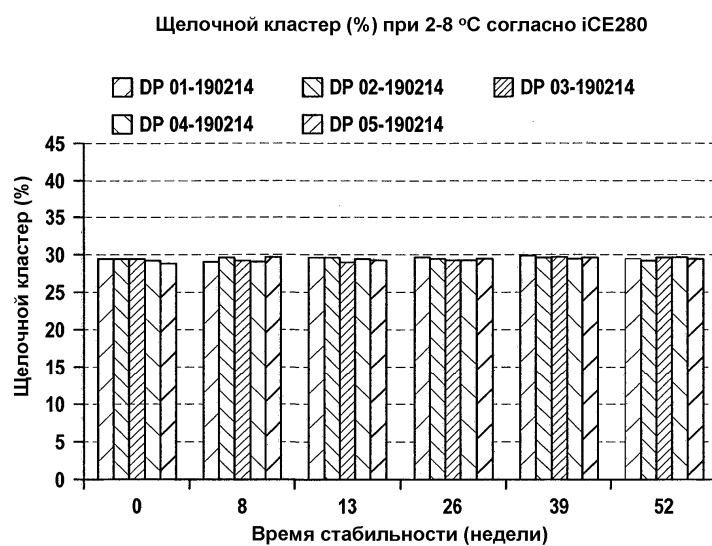
Фиг. 13



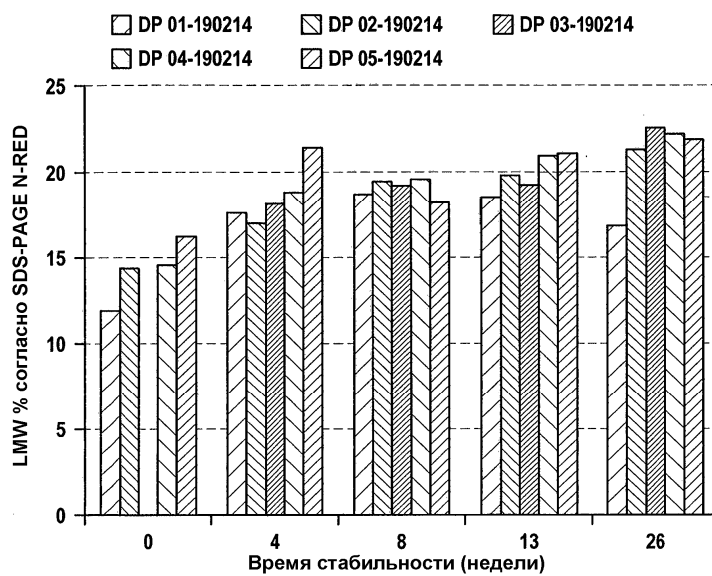
Фиг. 14



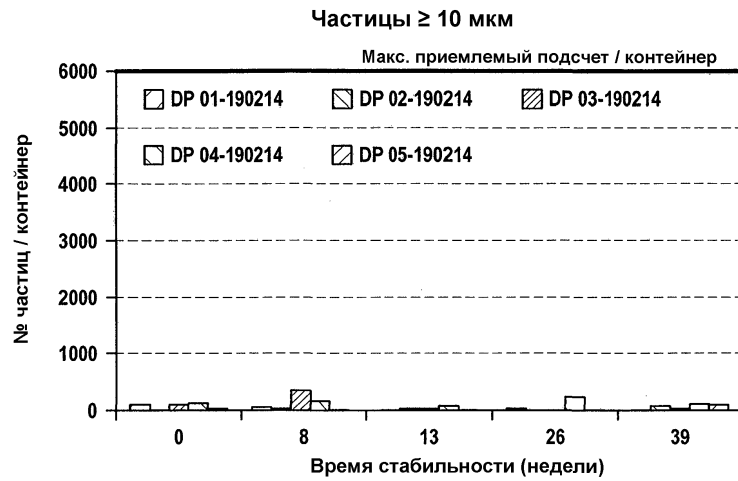
Фиг. 15



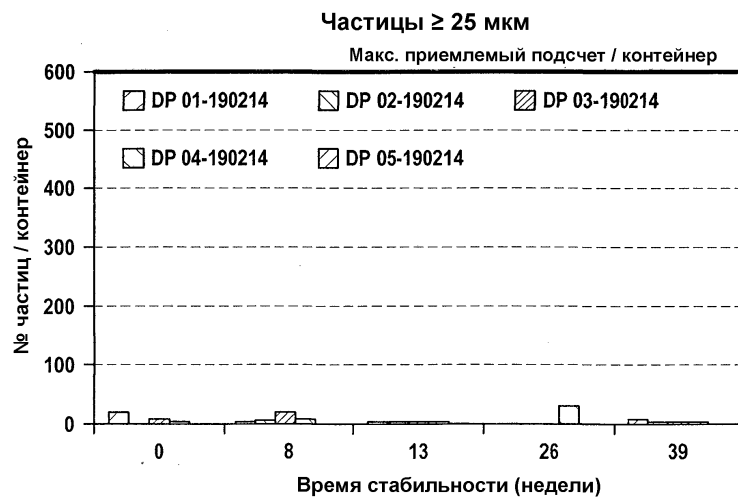
Фиг. 16



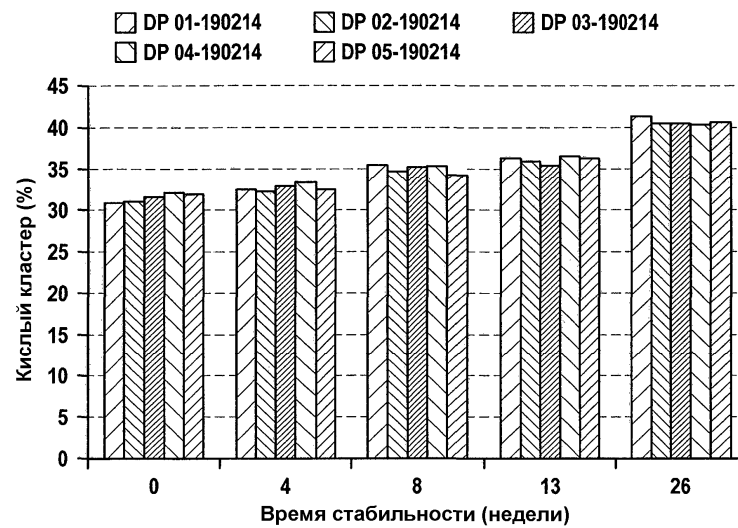
Фиг. 17



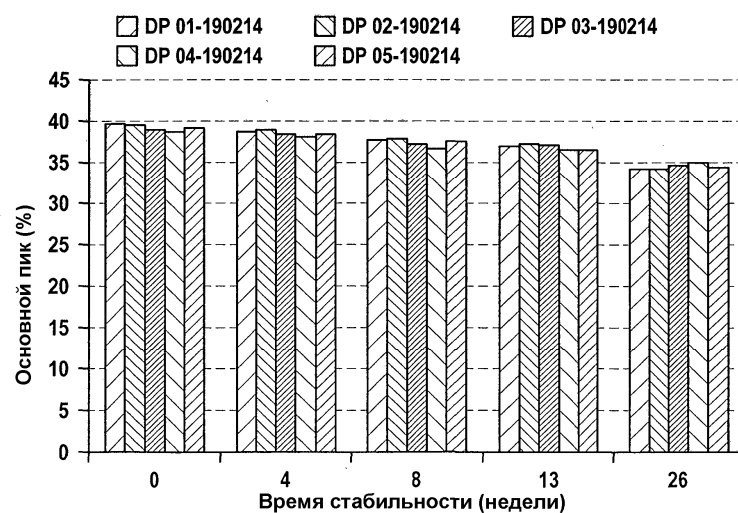
Фиг. 18



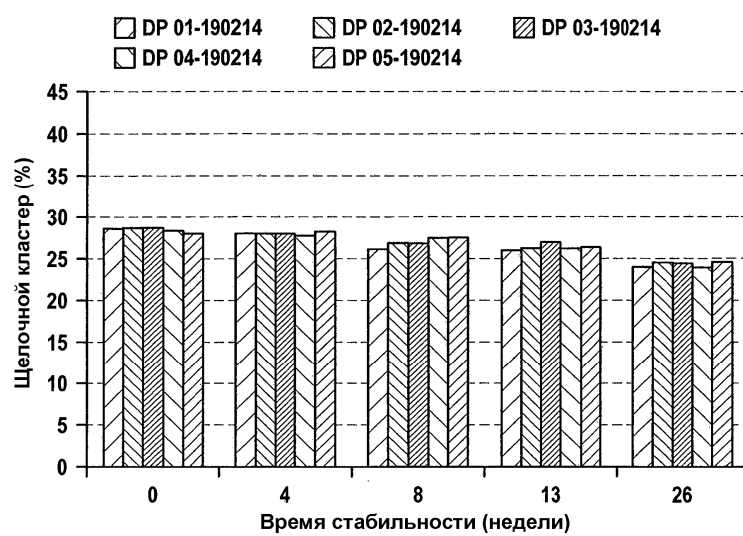
Фиг. 19



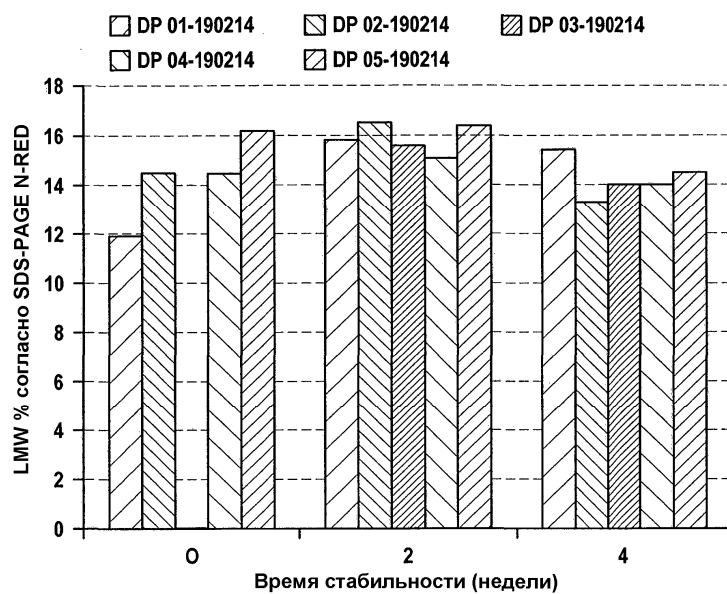
Фиг. 20



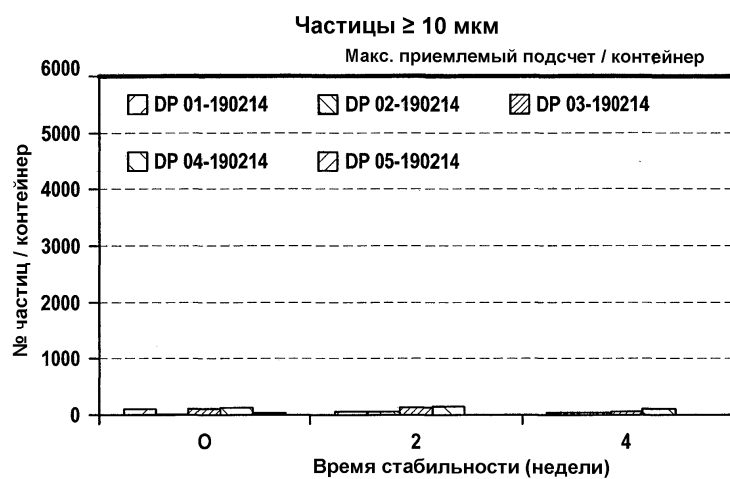
Фиг. 21



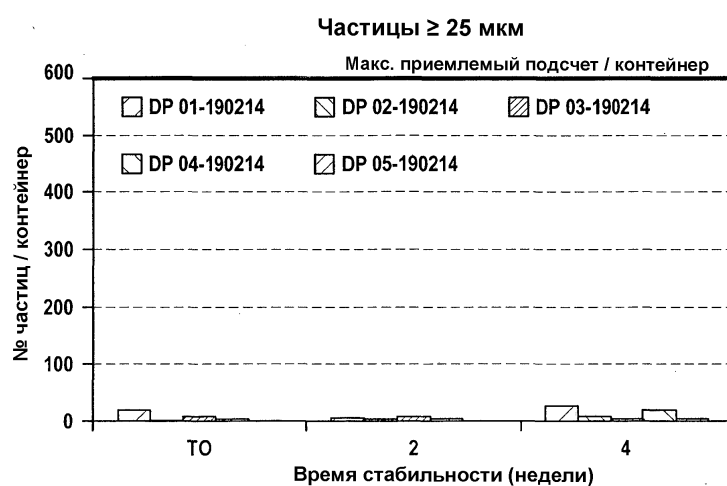
Фиг. 22



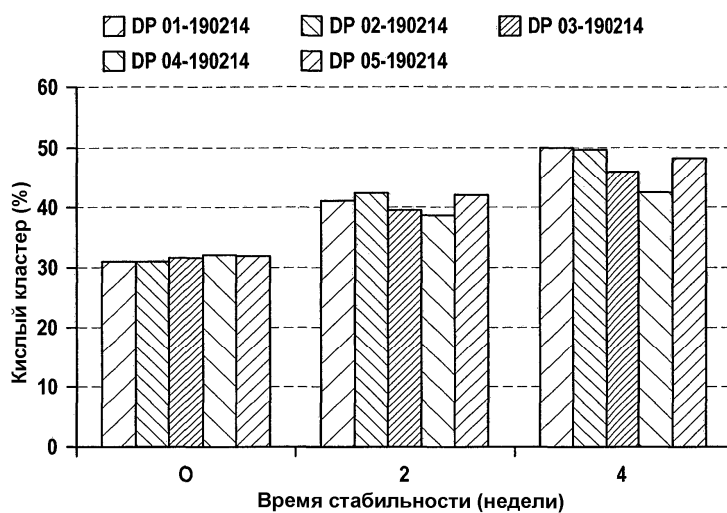
Фиг. 23



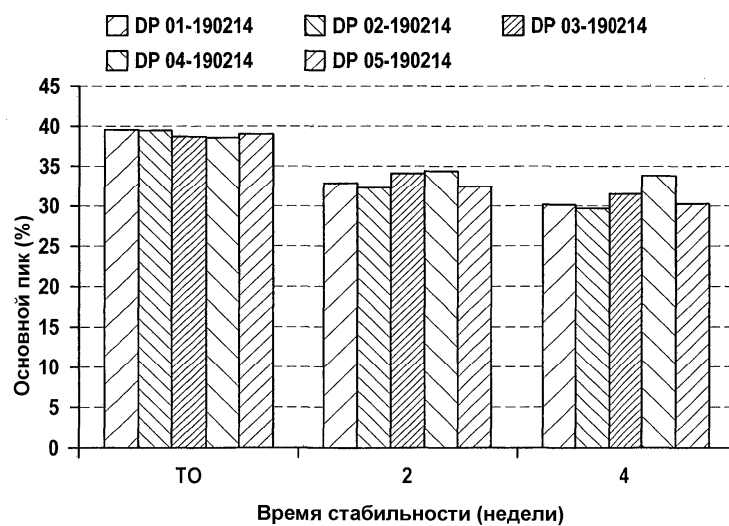
Фиг. 24



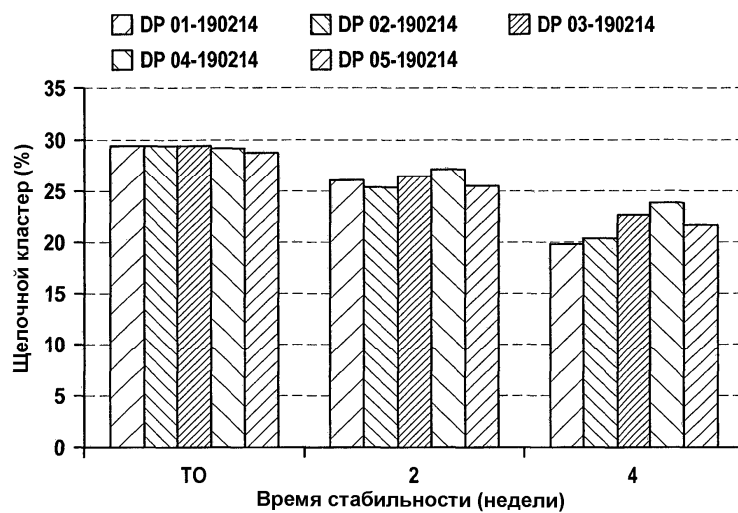
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28

