

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293085** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.27

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.14

(54) РАЗБАВИТЕЛЬ СОСТАВА АНТИТЕЛА

(31) 20179607.5

(32) 2020.06.12

(33) EP

(86) PCT/EP2021/065933

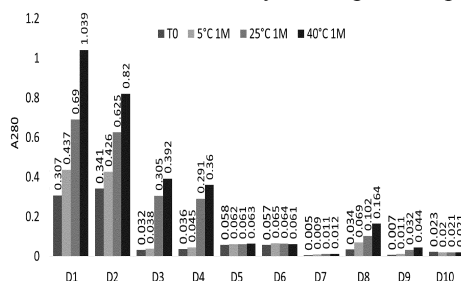
(87) WO 2021/250275 2021.12.16

(71) Заявитель:
ИХНОС САЙЕНСИЗ СА (CH)

(72) Изобретатель:
Дубей Сачин, Гассья Брайс (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к разбавителю для разбавления лекарственного продукта, который содержит мультиспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин, с получением лекарственного продукта, готового для введения пациенту путем инфузии. В частности, разбавитель согласно настоящему изобретению обеспечивает минимальную потерю материала антитела.



A1

202293085

202293085

A1

РАЗБАВИТЕЛЬ СОСТАВА АНТИТЕЛА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к разбавителю для разбавления лекарственного продукта, который содержит мультиспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин, с целью
5 получения лекарственного продукта, готового для введения пациенту путем инфузии. В частности, разбавитель согласно настоящему изобретению обеспечивает минимальную потерю материала антитела.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фармацевтический состав терапевтического продукта обычно содержит также, помимо
10 активного фармацевтического ингредиента (АФИ) с терапевтическими свойствами, неактивные ингредиенты или вспомогательные вещества, которые способствуют стабильности, биодоступности и эффективности АФИ.

Примеры вспомогательных веществ включают растворители, разбавители, буферные агенты, агенты, регулирующие pH, поверхностно-активные вещества, консерванты, регулирующие
15 тоничность агенты, антиоксиданты и т. д. Соответствующие вспомогательные вещества выбирают на основании формы лекарственного продукта, пути введения и дозировки введения, а также на основании их влияния на стабильность АФИ.

Биологические молекулы, такие как белки, например, антитела, разрабатываются в настоящее время в качестве терапевтических средств для лечения различных заболеваний от рака до
20 аутоиммунных заболеваний. Принимая во внимание низкие концентрации, в которых может потребоваться введение некоторых терапевтических антител, важно убедиться, что лекарственный продукт имеет соответствующий состав и что он разбавлен разбавителями, которые будут поддерживать стабильность белка и при этом ограничивать его адсорбцию на поверхностях контейнеров, используемых для хранения и для введения, таких как флаконы,
25 шприцы, системы для инфузии (пакеты, катетеры, фильтры и т. д.). В некоторых случаях, например, для биспецифичных антител ViTE[®], фармацевтические композиции, обеспечивающие высокий уровень извлечения белка из контейнеров для введения, содержат консервант, такой как бензиловый спирт, функция которого заключается в ингибировании роста микробов (WO2018204907). Тем не менее, несмотря на пользу консервантов в
30 предотвращении микробной контаминации, было показано, что они могут вызывать физическую нестабильность лекарственных средств на основе белка из-за структурных

изменений и агрегации белков (Correlating the Effects of Antimicrobial Preservatives on Conformational Stability, Aggregation Propensity, and Backbone Flexibility of an IgG1 mAb. Jayant Arora et al. Journal of Pharmaceutical Sciences 106 (2017) 1508-1518). Кроме того, дополнительные исследования показали токсичность некоторых консервантов для нейронов человека, в том числе в зависимости от их концентраций (The relative toxicity of compounds used as preservatives in vaccines and biologics. David A. Geier et al. Med Sci Monit, 2010; 16(5): SR21-27).

Таким образом, при получении терапевтических белков, таких как антитела, разработка разбавителей, обеспечивающих стабильность и высокий уровень извлечения терапевтических антител для введения пациентам необходимого количества стабильного терапевтического лекарственного средства, все еще остается проблемой.

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к разбавителю для разбавления лекарственного продукта, который содержит буфер и один или более стабилизирующих или регулирующих тоничность агентов, причем указанный лекарственный продукт содержит мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела, содержащий первый и второй сконструированный домен СНЗ, и при этом при разбавлении указанного лекарственного продукта указанным разбавителем получают лекарственный продукт, готовый для введения пациенту путем инфузии, характеризующийся тем, что указанный разбавитель такой, что потеря материала антитела в системе для инфузии, измеренная с помощью ИФА, составляет менее, чем приблизительно 30%.

В частности, разбавитель согласно настоящему изобретению имеет рН от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,5.

Согласно одному варианту реализации разбавитель в соответствии с настоящим изобретением содержит буфер, выбранный из группы, включающей гистидин, трис, цитрат, фосфат и цитрат-фосфат, причем указанный буфер присутствует в указанном разбавителе в концентрации, равной или меньшей 30 мМ.

Согласно другому варианту реализации разбавитель в соответствии с настоящим изобретением содержит стабилизирующий или регулирующий тоничность агент, выбранный из группы, включающей полиолы, такие как полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 80,

аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, глицин, метионин, пролин, лизин, соли, например, хлорид натрия.

Согласно определенным конкретным вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит буфер, выбранный из группы, включающей гистидин, трис и фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие аргинин, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 100 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,05% (масс./об.) или в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 7 или приблизительно 7,4.

Согласно другим конкретным вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит цитратный буфер, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 1,1 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие лизин-НСl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 62 мМ, хлорид натрия, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 154 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН от приблизительно 6,6 до приблизительно 7.

Согласно дополнительным конкретным вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит буфер, выбранный из группы, включающей гистидин, фосфат, цитрат и цитрат-фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие аргинин-НСl или лизин-НСl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН, выбранный из группы, включающей приблизительно 6, приблизительно 6,5 и приблизительно 7.

Согласно определенным более конкретным вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит буфер, выбранный из группы, включающей фосфат, цитрат и цитрат-фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты,

содержащие аргинин-HCl или лизин-HCl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6,5 или приблизительно 7 и стабилен при приблизительно 5°C и/или приблизительно 25°C, и/или при 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

Согласно другим более конкретным вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит буфер, выбранный из фосфата или цитрата-фосфата, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие аргинин-HCl или лизин-HCl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6 или приблизительно 6,5 и стабилен при приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 29 месяцев, при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 12 месяцев и при 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

Согласно особенно конкретному варианту реализации разбавитель, раскрытый в настоящем документе, содержит фосфатный буфер, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, состоящие из аргинина-HCl, присутствующего в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6 и стабилен при приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 29 месяцев, при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 12 месяцев и при 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения изотонический раствор, выбранный из группы, включающей физиологический раствор, раствор декстрозы и комбинацию физиологического раствора и раствора декстрозы, смешивают с разбавителем, раскрытым в настоящем документе, в соотношении приблизительно 1:10.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела присутствует в готовом для

введения лекарственном продукте в концентрации от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 20 нг/мл.

Согласно более конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела присутствует в готовом для введения
5 лекарственном продукте в концентрации приблизительно 10 нг/мл.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения первый сконструированный домен СН3 мультиспецифичного гетеродимерного антитела или фрагмента указанного гетеродимерного антитела содержит замены из группы, состоящей из: S20K, T22V, K26T, K79Y, F85.1S, Y86V, K88W, T90N, и второй сконструированный домен СН3 содержит замены из группы,
10 состоящей из: Q3E, Y5A, L7F, S20T, T22V, K26T, T81D, V84L, D84.2E, F85.1A, Y86S, K88R, T90R, и гетеродимерный иммуноглобулин или гетеродимерный фрагмент гетеродимеризуются посредством указанных первого и второго сконструированных доменов СН3.

Согласно дополнительному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или
15 фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с первой мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16, со второй мишенью, отличной от первой мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16, и с третьей мишенью, отличной от первой мишени или отличной от первой и
20 второй мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16.

Согласно конкретным аспектам мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с первой мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и
25 CD16, и со второй мишенью, отличной от первой мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16.

Согласно определенным конкретным вариантам реализации мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела представляет
30 собой биспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, или

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, или содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9, или аминокислотные последовательности, гомологичные по меньшей мере на 80% аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 1-9.

5 Настоящее изобретение также относится к лекарственному продукту, готовому для введения пациенту для применения при лечении рака, полученному с помощью этапов, включающих:

(i) очистку мультиспецифичного гетеродимерного антитела или фрагмента указанного гетеродимерного антитела с получением лекарственного вещества;

10 (ii) добавление вспомогательных веществ к лекарственному веществу с получением стабильного фармацевтического состава, причем указанный стабильный фармацевтический состав может быть жидким или лиофилизированным, или восстановленным;

(iii) добавление к стабильному фармацевтическому составу разбавителя в соответствии с настоящим изобретением;

15 причем указанный готовый для введения лекарственный продукт вводят пациенту путем инфузии, и указанный разбавитель такой, что потеря материала антитела в системе для инфузии, измеренная с помощью ИФА, составляет менее, чем приблизительно 30%.

В настоящем документе следующие термины имеют следующие значения: при каждом употреблении существительные относятся как к единственному, так и к множественному числу, если из контекста явно не следует иное. Если не указано иное, научные и технические термины, используемые применительно к настоящему изобретению, должны иметь значения, обычно известные средним специалистам в данной области техники. Кроме того, если иное не следует из контекста, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. Обычно номенклатура, используемая в связи с клеточными и тканевыми культурами, молекулярной биологией и химией белков и олиго- или полинуклеотидов, а также относящиеся к ним методики, лабораторные процедуры и методики аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники.

25

Температуры выше 0°C в настоящем изобретении выражаются либо путем предшествующего значению температуры знака «+», либо без него, например, 25°C и +25°C могут использоваться взаимозаменяемо в соответствии с настоящим изобретением.

30

- Настоящее изобретение относится к разбавителю для разбавления лекарственного продукта, который содержит буфер и один или более стабилизирующих или регулирующих тоничность агентов, причем указанный лекарственный продукт содержит мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела, содержащий
- 5 первый и второй сконструированный домен СНЗ, и при этом при разбавлении указанного лекарственного продукта указанным разбавителем получают лекарственный продукт, готовый для введения пациенту путем инфузии, характеризующийся тем, что указанный разбавитель такой, что потеря материала антитела в системе для инфузии, измеренная с помощью ИФА, составляет менее, чем приблизительно 30%.
- 10 В соответствии с настоящим изобретением потерю материала антитела измеряют путем измерения концентрации антитела до и после инкубации в системе для инфузии. Концентрацию антитела измеряют согласно настоящему документу с помощью ИФА. Термин «ИФА» относится к твердофазному иммуноферментному анализу, описанному в настоящем документе или иным образом известному в данной области техники. Обычные
- 15 анализы методом ИФА, как правило, включают использование первичных или вторичных антител, которые связаны (конъюгированы) с ферментом, который воздействует на субстрат, продуцируя детектируемый сигнал (например, продукция окрашенного продукта), чтобы указать на присутствие антигена или другого анализируемого вещества. В настоящем документе термин «ИФА» также охватывает использование неферментных репортеров, таких
- 20 как флуорогенные, электрохемилюминесцентные репортеры или репортеры на основе ПЦР в реальном времени, которые генерируют поддающиеся количественному определению сигналы. Следует понимать, что термин «ИФА» охватывает ряд вариантов, включая, но не ограничиваясь перечисленными, «прямой», «непрямой», «сэндвич», «конкурентный» и «обратный» ИФА.
- 25 В анализе ИФА обычно некоторое количество антигена иммобилизуют на твердой поверхности, а затем на поверхность добавляют специфичное антитело, которое распознает антиген, чтобы обеспечить образование комплекса антиген-антитело. В прямом ИФА для детектирования антигена используется меченое первичное антитело (например, конъюгат антитело-фермент), в то время как в непрямом ИФА антиген связывается первичным
- 30 антителом, которое затем детектируется меченым вторичным антителом. ИФА в формате «сэндвич» (также известный как ИФА с захватом) относится к иммобилизации захватывающего антитела (специфичного в отношении антигена) на твердой подложке с

последующим добавлением некоторого количества антигена. Связанный антиген затем детектируется вторым антителом (т.е. детектирующим антителом), которое распознает область на антигене, отличную от области захватывающего антитела. Захваченный антиген детектируется с помощью детектирующего антитела, которое может быть ковалентно связано с ферментом или само поддается детектированию путем добавления вторичного антитела, конъюгированного с ферментом. Прямые, непрямые анализы методом ИФА и ИФА в формате «сэндвич» могут быть адаптированы для выполнения в конкурентном формате. В конкурентном ИФА концентрация антигена или антитела в образце измеряется как изменение ожидаемого выходного сигнала от меченого антитела или антигена, соответственно, с известной концентрацией. Например, конкурентный ИФА можно выполнять путем иммобилизации захватывающего антитела, специфичного в отношении антигена, на поверхности и его инкубации с образцом, содержащим целевой антиген и известное количество меченого ферментом целевого антигена. Чем больше антигена присутствует в образце, тем меньше конъюгированного антигена будет связываться с захватывающим антителом. При добавлении субстрата фермента производимый сигнал обратно пропорционален количеству антигена, присутствующего в образце. В отличие от методик, описанных выше, при обратном ИФА антигены остаются суспендированными в жидкости. В частности, антитела и антигены инкубируют вместе, инкубированную жидкость переносят в очистительный контейнер для удаления несвязанного антитела, а оставшиеся комплексы антитела и антигена измеряют с помощью проточной цитометрии.

Другие эквивалентные методики измерения потери материала антитела при низкой концентрации включают, но не ограничиваются перечисленными, мезомасштабное обнаружение и масс-спектрометрический анализ.

В соответствии с настоящим изобретением термин «лекарственный продукт» относится к продукту, содержащему активный фармацевтический ингредиент (АФИ), также известный как лекарственное вещество (ЛВ), в конечной лекарственной форме, готовой для введения пациенту. Например, лекарственный продукт может быть получен путем очистки ЛВ, такого как белок, подобный антителу или фрагменту антитела, с последующим добавлением вспомогательных веществ к лекарственному веществу с получением стабильного фармацевтического состава, который может быть жидким или лиофилизированным, или восстановленным. Лекарственный продукт может быть «разбавленным», если разбавитель добавляется для придания готовности для введения, например, через систему для инфузии.

«Физическая стабильность» белка в фармацевтическом составе сохраняется, если в нем не наблюдают признаков агрегации, преципитации и/или денатурации при визуальном исследовании цвета и/или прозрачности или при измерении с помощью рассеяния УФ-света или эксклюзионной хроматографии. «Химическую стабильность» белка можно оценить 5 путем детектирования и количественного определения химически измененных форм белка. Химическое изменение может включать модификацию размера (например, расщепление связей), которую можно оценить, например, с помощью эксклюзионной хроматографии, электрофореза в ДСН-ПААГ и/или времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI/TOF MS). Другие типы химического 10 изменения включают изменение заряда (например, происходящее в результате дезамидирования), которое можно оценить с помощью ионообменной хроматографии, например.

«Жидкий» состав представляет собой состав, приготовленный в жидком формате. Такой состав может подходить для непосредственного введения субъекту или, альтернативно, 15 может быть упакован для хранения либо в жидкой форме, либо в замороженном состоянии, либо в высушенной форме (например, лиофилизированной) для последующего восстановления в жидкую форму или другие формы, подходящие для введения субъекту.

«Ллиофилизированный» состав представляет собой состав, приготовленный путем сублимационной сушки жидкого состава или состава перед лиофилизацией. 20 Сублимационную сушку можно выполнять путем замораживания состава и последующего сублимирования льда из замороженного содержимого при температуре, подходящей для первичной сушки. В этих условиях температура продукта ниже температуры коллапса состава. Затем можно осуществлять вторую стадию сушки, в результате которой получают подходящий лиофилизированный осадок.

«Восстановленный» состав представляет собой состав, приготовленный путем растворения лиофилизированного белкового состава в среде для восстановления так, что белок диспергируется в восстановленном составе. Восстановленный состав должен быть пригоден для введения (например, парентерального введения) субъекту, подлежащему лечению 25 белком, представляющим интерес.

Подходящие «среды для восстановления», которые можно применять для приготовления восстановленного состава, включают среды, которые являются фармацевтически 30

приемлемыми (безопасными и нетоксичными для введения человеку). Примеры подходящих сред для восстановления включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), воду для инъекций (WFI), раствор с контролируемым рН, например, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы и буфер, используемый для приготовления фармацевтического состава.

Готовый для введения лекарственный продукт согласно настоящему изобретению готов для введения пациенту одним или более путями введения с использованием одного или более из множества способов, известных в данной области техники.

10 «Пациент» для целей настоящего изобретения включает как людей, так и других животных, предпочтительно млекопитающих и наиболее предпочтительно человека. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению находят применение как в терапии человека, так и в ветеринарии.

Специалист в данной области техники поймет, что путь и/или способ введения будет варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Более предпочтительными путями введения являются внутривенный или подкожный. Выражение «парентеральное введение» в контексте настоящего документа
15 означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную,
20 внутриспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В качестве альтернативы, антитело согласно настоящему изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

30 Согласно конкретному варианту реализации готовый для введения лекарственный продукт согласно настоящему изобретению вводят путем инфузии, например, внутривенно или

подкожно, с помощью системы для инфузии или набора для инфузии, содержащего один или более элементов, выбранных из группы, включающей пакет для инфузии, набор для инфузии, катетер, фильтр, иглу, капельницу, шприц, помпу, запорный кран, клапан, канюлю, пробирку, колпачок, иглу для прокола, катушку, камеру, коннектор, порт, наконечник Люера.

- 5 В соответствии с настоящим изобретением разбавитель минимизирует потерю материала антитела в контейнерах, используемых для хранения и/или для введения, таких как флаконы, шприцы, пробирки, пробирки Falcon, системы для инфузии, содержащие один или более элементов, выбранных из группы, включающей пакет для инфузии, набор для инфузии, катетер, фильтр, иглу, капельницу, шприц, помпу, запорный кран, клапан, канюлю, пробирку,
- 10 колпачок, иглу для прокола, катушку, камеру, коннектор, порт, наконечник Люера, причем такие контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, включая пластик и стекло. В частности, в соответствии с настоящим изобретением готовый для введения лекарственный продукт вводят пациенту путем инфузии, и разбавитель обеспечивает минимизацию потери материала антитела в системе для инфузии. Более конкретно, потеря
- 15 материала антитела составляет менее приблизительно 50% или менее приблизительно 40%, или менее приблизительно 30%, или менее приблизительно 29%, или приблизительно 28%, или приблизительно 27%, или приблизительно 26%, или приблизительно 25%, или приблизительно 24%, или приблизительно 23%, или приблизительно 22%, или приблизительно 21%, или приблизительно 20%, приблизительно 19%, или приблизительно
- 20 18%, или приблизительно 17%, или приблизительно 16%, или приблизительно 15%, или приблизительно 14%, или приблизительно 13%, или приблизительно 12%, или приблизительно 11%, или приблизительно 10%, приблизительно 9%, или приблизительно 8%, или приблизительно 7%, или приблизительно 6%, или приблизительно 5%, или приблизительно 4%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2%, или приблизительно
- 25 1%. Предпочтительно потеря материала антитела составляет менее, чем приблизительно 30%, более предпочтительно менее, чем приблизительно 20%, еще более предпочтительно менее, чем приблизительно 10%, наиболее предпочтительно менее, чем 5%.

В соответствии с настоящим изобретением разбавитель содержит буфер и один или более стабилизирующих или регулирующих тоничность агентов.

- 30 Термин «буфер» в контексте настоящего документа относится к забуференному раствору, который устойчив к изменениям pH за счет действия его кислотно-щелочных конъюгированных компонентов. Буфер согласно настоящему изобретению имеет pH в

диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0; предпочтительно буфер имеет рН, выбранный из группы, включающей рН, равный приблизительно 5, приблизительно 5,5, приблизительно 6, приблизительно 6,5, приблизительно 6,9, приблизительно 7, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 8. В настоящем изобретении также раскрыты буферы с любым значением рН между указанными выше значениями.

Примеры буферов, которые могут контролировать рН в этом диапазоне, включают лимонную кислоту, ацетат (например, ацетат натрия), сукцинат (например, сукцинат натрия), глюконат, аминокислоты, такие как гистидин (например, гистидин-HCl), цитрат, фосфат, цитрат-фосфат, трис, другие буферы на основе органических кислот, их соли и комбинации буферов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения буфер присутствует в готовом для введения лекарственном продукте в концентрации, равной или меньше приблизительно 30 мМ. Согласно определенным вариантам реализации концентрация буфера составляет от приблизительно 1 мМ до приблизительно 30 мМ; предпочтительно буфер присутствует в готовом для введения лекарственном продукте в концентрации, выбранной из группы, включающей приблизительно 1 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 5 мМ, приблизительно 7 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 25 мМ и приблизительно 30 мМ. Согласно предпочтительному варианту реализации буфер присутствует в готовом для введения лекарственном продукте согласно настоящему изобретению в концентрации приблизительно 25 мМ. Согласно другому предпочтительному варианту реализации буфер присутствует в готовом для введения лекарственном продукте согласно настоящему изобретению в концентрации приблизительно 1 мМ. Настоящее изобретение также включает буфер, концентрация которого представляет собой любое промежуточное значение между указанными выше значениями.

Стабилизирующий или регулирующий тоничность агент выбран из группы, включающей ацетат натрия, бикарбонат натрия, карбонат натрия, хлорид натрия (NaCl), ацетат калия, бикарбонат калия, карбонат калия, хлорид калия, хлорид кальция (CaCl₂), глутамат, сахара, такие как сахароза, глюкоза и трегалоза, полиолы, такие как маннит, мальтит, сорбит, ксилит, эритрит и изомальт, полиэтиленгликоль, такой как ПЭГ400, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), аминокислоты, такие как гистидин (например, гистидин-HCl), аргинин (например, гидрохлорид аргинина) и глицин, метионин, пролин, лизин (например, лизин-HCl), глутаминовая кислота, глутамин, цистеин, амины, глутатион, циклодекстрин, такой как гидроксипропил-β-циклодекстрин (HPBCD), гидроксипропил-сульфобутил-β-циклодекстрин

(HPSBCD), сульфобутиловый простой эфир β -циклодекстрина (SBECD), β -циклодекстрин (BetaCD), α -циклодекстрин (Alpha CD) и γ -циклодекстрин (Gamm CD), и поверхностно-активные вещества. Неограничивающие примеры типичного поверхностно-активного вещества включают: неионогенные поверхностно-активные вещества (HLB от 6 до 18), такие как сложные эфиры сорбитана и жирных кислот (например, монокаприлат сорбитана, монолаурат сорбитана, монопальмитат сорбитана), сложные эфиры глицерина и жирных кислот (например, монокаприлат глицерина, мономиристат глицерина, моностеарат глицерина), сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот (например, декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат, декаглицерилмонолинолеат), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, монолаурат полиоксиэтиленсорбитана, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана, моностеарат полиоксиэтиленсорбитана, монопальмитат полиоксиэтиленсорбитана, триолеат полиоксиэтиленсорбитана, тристеарат полиоксиэтиленсорбитана), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и жирных кислот (например, тетрастеарат полиоксиэтиленсорбита, тетраолеат полиоксиэтиленсорбита), сложные эфиры полиоксиэтиленглицерина и жирных кислот (например, полиоксиэтиленглицерилмоностеарат), сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот (например, дистеарат полиэтиленгликоля), алкиловые простые эфиры полиоксиэтилена (например, лауриловый простой эфир полиоксиэтилена), простые алкиловые эфиры полиоксиэтилен-полиоксипропилена (например, гликолевый простой эфир полиоксиэтилен-полиоксипропилена, пропиловый простой эфир полиоксиэтилен-полиоксипропилена, цетиловый простой эфир полиоксиэтилен-полиоксипропилена), алкилфениловые простые эфиры полиоксиэтилена (например, нонилфениловый простой эфир полиоксиэтилена), полиоксиэтиленированные гидрогенизированные касторовые масла (например, полиоксиэтиленированное касторовое масло, полиоксиэтиленированное гидрогенизированное касторовое масло), полиоксиэтиленовые производные пчелиного воска (например, полиоксиэтиленсорбитное производное пчелиного воска), полиоксиэтиленовые производные ланолина (например, полиоксиэтиленланолин) и полиоксиэтиленовые амиды жирных кислот (например, полиоксиэтиленстеариламид); анионные поверхностно-активные вещества, такие как соли цис-цис-алкилсульфатов (например, цетилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия, олеилсульфат натрия), сульфатные соли полиоксиэтилен-цис-цис-алкиловых простых эфиров со средним содержанием этиленоксида 2-4 моль (например, полиоксиэтиленлаурилсульфат натрия) и соли Cs-цис-алкилсульфосукцинатного сложного эфира (например, натриевая соль

лаурилсульфосукцинатного сложного эфира); природные поверхностно-активные вещества, такие как лецитин, глицерофосфолипид, сфингофосфолипиды (например, сфингомиелин) и сложные эфиры сахарозы и C12-C18 жирных кислот; полочсамеры, такие как полочсамер 188, полочсамер 407, полочсамер 124, полочсамер 237, полочсамер 338, поливинилпирролидон, соли и комбинации указанных выше компонентов. Предпочтительно поверхностно-активное вещество выбрано из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот. Предпочтительно поверхностно-активное вещество выбрано из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот. Особенно предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 и 85, наиболее предпочтительно полисорбат 80. Полисорбат 80 также известен под торговой маркой Tween 80™ (ICI Americas, Inc.).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения один или более стабилизирующих или регулирующих тоничность агентов выбраны из группы, включающей полисорбат 80, аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, глицин, метионин, пролин, лизин, соли, такие как хлорид натрия. Согласно более конкретному варианту реализации стабилизирующий или регулирующий тоничность агент выбран из группы, включающей аргинин или аргинин-HCl, лизин или лизин-HCl, NaCl и полисорбат 80. В частности, аргинин или аргинин-HCl присутствует в готовом для введения лекарственном продукте в концентрации от приблизительно 50 mM до приблизительно 800 mM, предпочтительно в концентрации, выбранной из группы, включающей приблизительно 50 mM, приблизительно 100 mM, приблизительно 150 mM, приблизительно 200 mM, приблизительно 250 mM, приблизительно 300 mM, приблизительно 350 mM, приблизительно 400 mM, приблизительно 450 mM, приблизительно 500 mM, приблизительно 550 mM, приблизительно 600 mM, приблизительно 650 mM, приблизительно 700 mM, приблизительно 750 mM и приблизительно 800 mM, более предпочтительно концентрация аргинина или аргинина-HCl составляет приблизительно 100 mM или приблизительно 500 mM; лизин или лизин-HCl присутствует в готовом для введения лекарственном продукте в концентрации от приблизительно 20 mM до приблизительно 800 mM, предпочтительно в концентрации, выбранной из группы, включающей приблизительно 20 mM, приблизительно 25 mM, приблизительно 30 mM, приблизительно 35 mM, приблизительно 40 mM, приблизительно 45 mM, приблизительно 50 mM, приблизительно 100 mM, приблизительно 150 mM, приблизительно 200 mM, приблизительно 250 mM, приблизительно 300 mM, приблизительно 350 mM, приблизительно

400 мМ, приблизительно 450 мМ, приблизительно 500 мМ, приблизительно 550 мМ, приблизительно 600 мМ, приблизительно 650 мМ, приблизительно 700 мМ, приблизительно 750 мМ и приблизительно 800 мМ, более предпочтительно концентрация лизина-НСI составляет приблизительно 500 мМ или приблизительно 62 мМ; NaCl присутствует в готовом для введения лекарственном продукте в концентрации от приблизительно 20 мМ до приблизительно 400 мМ, предпочтительно в концентрации, выбранной из группы, включающей приблизительно 20 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 35 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 200 мМ, приблизительно 250 мМ, приблизительно 300 мМ, приблизительно 350 мМ, приблизительно 400 мМ, более предпочтительно концентрация NaCl составляет приблизительно 154 мМ; полисорбат 80 присутствует в указанном готовом для введения лекарственном продукте в концентрации от приблизительно 0,001% (масс./об.) до приблизительно 0,1%, предпочтительно в концентрации, выбранной из группы, включающей приблизительно 0,001% (масс./об.); приблизительно 0,002% (масс./об.), приблизительно 0,004% (масс./об.), приблизительно 0,006% (масс./об.), приблизительно 0,008% (масс./об.), приблизительно 0,01% (масс./об.), приблизительно 0,02% (масс./об.), приблизительно 0,04% (масс./об.), приблизительно 0,05% (масс./об.), приблизительно 0,06% (масс./об.), приблизительно 0,08% (масс./об.), приблизительно 0,1% (масс./об.), более предпочтительно в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), или приблизительно 0,04% (масс./об.), приблизительно 0,05% (масс./об.). Настоящее изобретение также включает стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, концентрация которых представляет собой любое промежуточное значение между указанными выше значениями.

Согласно одному варианту реализации разбавитель в соответствии с настоящим изобретением содержит буфер, выбранный из группы, включающей гистидин, трис и фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие аргинин, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 100 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,05% (масс./об.) или в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), и разбавитель имеет рН приблизительно 7 или приблизительно 7,4.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения разбавитель согласно настоящему изобретению содержит цитратный буфер, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 1,1 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие лизин-НСl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 62 мМ, хлорид натрия, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 154 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), и разбавитель имеет рН от приблизительно 6,6 до приблизительно 7. В частности, разбавитель согласно настоящему изобретению содержит лимонную кислоту, присутствующую в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 2,1 г/л, NaCl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 9,0 г/л, лизин-НСl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 91,0 г/л, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), и разбавитель имеет рН от приблизительно 6,6 до приблизительно 7, в частности, рН, выбранный из группы, включающей приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7.

Согласно другим вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит буфер, выбранный из группы, включающей гистидин, фосфат, цитрат и цитрат-фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие аргинин-НСl или лизин-НСl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и при этом указанный разбавитель имеет рН, выбранный из группы, включающей приблизительно 6, приблизительно 6,5 и приблизительно 7.

Согласно предпочтительному варианту реализации разбавитель, раскрытый в настоящем документе, содержит фосфатный буфер, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, стабилизирующий или регулирующий тоничность агент, состоящий из аргинина-НСl, присутствующего в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6.5. Согласно другому предпочтительному варианту реализации разбавитель, раскрытый в настоящем документе, содержит цитрат-фосфатный буфер,

присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, стабилизирующий или регулирующий тоничность агент, состоящий из лизина-НСl, присутствующего в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6.0. Согласно более предпочтительному варианту реализации разбавитель, раскрытый в настоящем документе, содержит фосфатный буфер, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, стабилизирующий или регулирующий тоничность агент, состоящий из аргинина-НСl, присутствующего в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6.

Согласно определенным более конкретным вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит буфер, выбранный из группы, включающей фосфат, цитрат и цитрат-фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие аргинин-НСl или лизин-НСl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6,5 или приблизительно 7 и стабилен при приблизительно 5°C и/или приблизительно 25°C, и/или при приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

Согласно другим более конкретным вариантам реализации разбавитель согласно настоящему изобретению содержит буфер, выбранный из фосфата или цитрата-фосфата, присутствующего в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержащие аргинин-НСl или лизин-НСl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6 или приблизительно 6,5 и стабилен при приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 29 месяцев, при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 12 месяцев и при приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

- Согласно особенно конкретному варианту реализации разбавитель, раскрытый в настоящем документе, содержит фосфатный буфер, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, стабилизирующий или регулирующий тоничность агент, состоящий из аргинина-HCl, присутствующего в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6 и стабилен при приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 29 месяцев, при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 12 месяцев и при приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.
- 10 Согласно одному аспекту настоящего изобретения изотонический раствор, выбранный из группы, включающей физиологический раствор, раствор декстрозы и комбинацию физиологического раствора и раствора декстрозы, смешивают с разбавителем, раскрытым в настоящем документе, в соотношении, выбранном из группы, включающей приблизительно 1:2, приблизительно 1:5, приблизительно 1:10, приблизительно 1:15, приблизительно 1:20, 15 предпочтительно в соотношении приблизительно 1:10.

Готовый для введения лекарственный продукт в соответствии с настоящим изобретением содержит мультиспецифичное антитело или фрагмент указанного антитела.

- Термины «антитело» или «иммуноглобулин» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к целым антителам и любым их антигенсвязывающим фрагментам или отдельным цепям. «Антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающему фрагменту. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи 20 состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), которые являются 25 гипервариабельными по последовательности и/или участвуют в распознавании антигена и/или обычно образуют структурно определенные петли, чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR или FW). Каждая VH 30

и VL состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3 и FW4. Аминокислотные последовательности FW1, FW2, FW3 и FW4 вместе составляют «не-CDR участок» или «невывступающий участок CDR» VH или VL, как указано в настоящем документе. Антитела сгруппированы в классы, также называемые изотипами, что определяется генетически по константной области. Константные легкие цепи человека классифицируются как легкие каппа (CK) и лямбда (CX) цепи. Тяжелые цепи классифицируются как мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эpsilon (ϵ) и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Таким образом, «изотип» в контексте настоящего документа означает любой из классов и/или подклассов иммуноглобулинов, определяемых химическими и антигенными характеристиками их константных областей. Известные изотипы иммуноглобулинов человека представляют собой IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) и IgE (IGHE). Класс IgG наиболее часто используется в терапевтических целях. У человека этот класс включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Фрагменты антител включают, но не ограничиваются ими, (i) фрагмент Fab, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, включая Fab' и Fab'-SH, (ii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного антитела; (iv) фрагмент dAb (Ward ES et al., (1989) *Nature*, 341 : 544-546), который состоит из одного вариабельного фрагмента, (v) фрагменты F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab, (vi) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который позволяет двум доменам ассоциироваться с образованием антигенсвязывающего сайта (Bird RE et al, (1988) *Science* 242: 423-426; Huston JS et al, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83), (vii) биспецифичные димеры одноцепочечных Fv (PCT/US92/09965), (viii) «диатела» или «тритела», мультивалентные или мультиспецифичные фрагменты, сконструированные путем слияния генов (Tomlinson I & Hollinger P (2000) *Methods Enzymol.* 326: 461-79; WO94/13804; Holliger P et al, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-48), и (ix) scFv, генетически слитый с таким же или другим антителом (Coloma MJ & Morrison SL (1997) *Nature Biotechnology*, 15(2): 159-163).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения раскрытое антитело является моноклональным.

Термин «моноклональное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителам, продуцируемым клональными клетками, которые все происходят из одной и той же отдельной клетки, и которые специфично связываются с одним и тем же эпитопом целевого антигена. При получении терапевтических антител предпочтение отдается созданию моноклональных антител по сравнению с поликлональными антителами. Фактически, в то время как моноклональные антитела продуцируются клетками, происходящими из одного клона, и все связывают один и тот же эпитоп, поликлональные антитела продуцируются разными иммунными клетками и распознают несколько эпитопов определенного антигена. Моноклональные антитела обеспечивают однородность между партиями, сниженную перекрестную реактивность и высокую специфичность в отношении мишени. Моноклональные антитела могут быть экспрессированы, например, в клетках-хозяевах с использованием рекомбинантной ДНК с получением рекомбинантного антитела.

Согласно определенному варианту реализации настоящего изобретения антитело представляет собой рекомбинантное антитело.

Термин «рекомбинантное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, полученному любым способом, включающим использование рекомбинантной ДНК. Рекомбинантное антитело можно сконструировать таким образом, чтобы улучшить характеристики, такие как иммуногенность, аффинность связывания, молекулярный размер, специфичность, время полужизни и формат. Примеры рекомбинантных антител включают, но не ограничиваются перечисленными, сконструированные антитела, химерные антитела, антитела с привитыми CDR (такие как гуманизированные антитела), полностью человеческие антитела, фрагменты антител, антитела со сконструированной Fc, мультиспецифичное антитело (такое как биспецифичное, триспецифичное, тетраспецифичное антитело), мономерные и мультимерные антитела (такие как гомодимерные и гетеродимерные антитела).

Согласно более конкретному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой гетеродимерное антитело, в частности, мультиспецифичное антитело или фрагмент указанного антитела представляет собой гетеродимерный иммуноглобулин или его гетеродимерный фрагмент, содержащий первый и второй сконструированные домены СН3.

Термин «гетеродимерное антитело» или «гетеродимерный фрагмент» или «гетеродимер» в контексте настоящего документа включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую по меньшей мере первый и второй полипептид, такой как первый и второй домен, причем указанный второй полипептид отличается по аминокислотной последовательности от указанного первого полипептида. Предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, причем указанная первая цепь имеет по меньшей мере один домен, не идентичный второй цепи, и при этом обе цепи собираются, т.е. взаимодействуют посредством своих неидентичных доменов. В частности, гетеродимерный иммуноглобулин содержит по меньшей мере два домена, причем указанный первый домен не идентичен указанному второму домену, и при этом оба домена собираются, т.е. взаимодействуют посредством своих белок-белковых контактных поверхностей. Более предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин обладает специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух разных лигандов, антигенов или сайтов связывания, т.е. является биспецифичным.

Термин «мультиспецифичное антитело» относится к любому антителу, имеющему два или более сайтов связывания, которые могут связывать два или более разных эпитопов одного и того же антигена или двух или более разных антигенов. Неограничивающие примеры мультиспецифичных антител представляют собой биспецифичные антитела, триспецифичные антитела, тетраспецифичные антитела. Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению является биспецифичным или триспецифичным, или тетраспецифичным, более предпочтительно оно является биспецифичным или триспецифичным. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения мультиспецифичное антитело или его фрагмент является биспецифичным.

Термин «гетеродимерный иммуноглобулин» или «гетеродимерный фрагмент» или «гетеродимер» в контексте настоящего документа включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую по меньшей мере первый и второй полипептид, такой как первый и второй домен, причем указанный второй полипептид отличается по аминокислотной последовательности от указанного первого полипептида. Предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, причем указанная первая цепь имеет по меньшей мере один домен, не идентичный второй цепи, и при этом обе цепи собираются, т.е. взаимодействуют посредством своих неидентичных доменов. В частности, гетеродимерный иммуноглобулин содержит по меньшей мере два домена, причем указанный первый домен не

идентичен указанному второму домену, и при этом оба домена собираются, т.е. взаимодействуют посредством своих белок-белковых контактных поверхностей. Более предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин обладает специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух разных лигандов, антигенов или сайтов связывания, т.е. является биспецифичным. Гетеродимерный иммуноглобулин в контексте настоящего документа включает, но не ограничивается перечисленными, полноразмерные биспецифичные антитела, биспецифичный Fab, биспецифичный F(ab')₂, биспецифичный scFv, слитый с областью Fc, диатело, слитое с областью Fc, и доменное антитело, слитое с областью Fc. Предпочтительно фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина содержит по меньшей мере два домена, причем указанный первый домен не идентичен указанному второму домену, и при этом оба домена собираются, т.е. взаимодействуют посредством своих белок-белковых контактных поверхностей. Более предпочтительно фрагмент гетеродимерного иммуноглобулина содержит по меньшей мере два сконструированных домена, причем указанный первый сконструированный домен не идентичен указанному второму сконструированному домену, т.е. первый сконструированный домен отличается по аминокислотной последовательности от второго сконструированного домена, и при этом оба сконструированных домена собираются путем взаимодействия посредством своих белок-белковых контактных поверхностей.

Термин «домен» в контексте настоящего документа включает любую область полипептида, которая отвечает за селективную сборку с белком-партнером (т.е. другим белком (или его областью) или другим доменом) и/или может выполнять полную биологическую функцию или часть, такую как связывание рецептора или субстрата, будь то независимо или в многодоменной молекуле. Обычно домен, упоминаемый в настоящем документе, не является шарнирной областью и/или не содержит шарнирной области. Домен может существовать независимо от остальной части белковой цепи. Домен образует компактную трехмерную структуру и независимо является стабильным и уложенным. Домены различаются по длине от приблизительно 25 аминокислот до 500 аминокислот в длину. Предпочтительно домены в контексте настоящего документа различаются по длине от приблизительно 70 аминокислот до приблизительно 120 аминокислот в длину. Самые короткие домены, такие как цинковые пальцы, стабилизированы ионами металлов или дисульфидными мостиками. Домены часто образуют функциональные единицы, такие как кальций-связывающий домен EF-руки кальмодулина. Поскольку они самостабильны, домены могут быть «переставлены местами» с

помощью генной инженерии между одним белком и другим для создания химерных белков. Иммуноглобулины состоят из переменных и константных доменов, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов (Williams AF and Barclay AN, *Annu Rev Immunol*, 6:381-405 (1988); Bork P et al, *J Mol Biol*, 242(4):309-20 (1994)). Домены, которые включены в

5 настоящий документ, представляют собой CH1 и CH3, в частности, встречающиеся в природе CH1 и CH3, из IGHA1, IGHA2, IGHD, IGHE, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHG5 и IGHM; CH4, в частности, встречающийся в природе CH4, из IGHE и IGHM; IGKC, IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7, в частности, встречающиеся в природе IGKC, IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7. Дополнительные домены, которые включены в настоящий документ,

10 представляют собой CH2, в частности, встречающийся в природе CH2, из IGHA1, IGHA2, IGHD, IGHE, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHG5 и IGHM. Предпочтительно в настоящем документе используются негликозилированные домены CH2, которые в своей негликозилированной форме представляют собой гомодимеры, как указано в настоящем документе. Домены CH2 в негликозилированном фрагменте Fc сближаются друг с другом

15 намного сильнее, чем домены CH2 в естественно гликозилированном фрагменте Fc. Кристаллическая структура мышинового негликозилированного фрагмента Fc IgG1 показала, что полностью негликозилированный фрагмент Fc может иметь «закрытую» структуру, при этом расстояние между Pro 332 из домена CH2 первой негликозилированной цепи иммуноглобулина и Pro 332 из домена CH2 второй негликозилированной цепи

20 иммуноглобулина составляет только 11,6 Å (Feige MJ et al., *J Mol Biol*, 391(3):599-608 (2009)). Дополнительные домены, которые включены в настоящий документ, представляют собой домены VH и VL, которые не имеют сконструированной белок-белковой контактной поверхности в соответствии с настоящим изобретением, т.е. которые не сконструированы намерено для модификации их встречающейся в природе белок-белковой контактной

25 поверхности, за исключением обратных мутаций, возникающих в результате процесса гуманизации.

Термин «сконструированная цепь иммуноглобулина» в контексте настоящего документа включает цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере один сконструированный домен с белок-белковой контактной поверхностью, который отличается от исходного домена.

30 Термин «сконструированный домен» в контексте настоящего документа включает домен, сконструированный из исходного домена и донорного домена.

В настоящем изобретении используется описанный способ на основе технологии BEAT[®] (РСТ публикация №: WO 2012/131555), который основан на уникальной концепции биомимикрии, которая показывает лучшую гетеродимеризацию по сравнению со способами предшествующего уровня техники. Технология BEAT основана на обмене контактными поверхностями между встречающимися в природе парами гомо- или гетеродимерных доменов иммуноглобулина для создания новых гетеродимеров, которые можно использовать в качестве строительных блоков для биспецифичных антител на основе Fc.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, содержащий первый и второй полипептиды, содержащие сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом СН3, имеющим белок-белковую контактную поверхность, причем указанная белок-белковая контактная поверхность первого полипептида содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT[®]), и причем указанная белок-белковая контактная поверхность второго полипептида содержит аминокислотную замену в положении 84.4 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT[®]).

Согласно дополнительному варианту реализации мультиспецифичное антитело или фрагмент указанного антитела в соответствии с настоящим изобретением представляет собой гетеродимерный иммуноглобулин или его гетеродимерный фрагмент, причем указанные первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом СН3, имеющим белок-белковую контактную поверхность, при этом указанная белок-белковая контактная поверхность первого полипептида содержит аминокислотную замену в положении 88 и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86 и 90 (нумерация IMGT[®]), и при этом указанная белок-белковая контактная поверхность второго полипептида содержит аминокислотную замену в положении 85.1 и/или 86 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 88 и 90 (нумерация IMGT[®]), при этом указанный аминокислотный остаток, замененный в положении 88 в первой сконструированной константной области иммуноглобулина, взаимодействует с аминокислотным остатком, замененным в положении 85.1 и/или 86 во второй сконструированной константной области иммуноглобулина, при этом указанное

аминокислотное положение каждого члена группы указано в соответствии с нумерацией IMGT®.

Предпочтительно аминокислотный остаток, который заменен в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88 W и его консервативные аминокислотные замены, при этом указанное аминокислотное положение указано в соответствии с нумерацией IMGT®. Более предпочтительно аминокислотный остаток, который заменен в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88 W, и при этом указанный дополнительный аминокислотный остаток, замененный в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из: 3A, 20V, 20T, 20A, 20N, 20Q, 20E, 20S, 20K, 20W, 22A, 22G, 22T, 22L, 22I, 22V, 26R, 26Q, 26T, 26K, 26V, 26S, 26N, 26E, 79Y, 85.IT, 85.IM, 85.1A, 85.IS, 85.1R, 85.1H, 85.IK, 85.IF, 85.1C, 85.IN, 85.1W, 86S, 86I, 86T, 86H, 86Q, 86V, 86W, 86Y, 86F и 90N, причем указанное аминокислотное положение указано в соответствии с нумерацией IMGT®.

Предпочтительно аминокислотный остаток, который заменен в положении 85 и 86 в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из: 85.1A, 85.IS, 85.1C и 86S и их консервативных аминокислотных замен (нумерация IMGT®). Более предпочтительно аминокислотный остаток, который заменен в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из: 85.1A, 85.IS, 85.1C и 86S, и при этом указанный дополнительный аминокислотный остаток, замененный в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из: 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 8ID, 84L, 84.2E, 88R и 90R и их консервативных аминокислотных замен (нумерация IMGT®).

Согласно предпочтительному варианту реализации аминокислотный остаток, который заменен в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88 W, и при этом указанный дополнительный аминокислотный остаток, замененный в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной константной области иммуноглобулина представляет собой: 3A, 20K, 22V, 26T, 79Y, 85.IS, 86V и 90N, и при этом указанные

аминокислотные остатки, которые заменены в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной константной области иммуноглобулина в положениях 85.1 и 86, представляют собой 85.1A, 85.IS или 85.1A и 86S, и при этом указанный дополнительный аминокислотный остаток, замененный в белок-белковой контактной поверхности второй

5 сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой: 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 8ID, 84L, 84.2E, 84.4Q, 88R и 90R (нумерация IMGT®).

Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, причем указанные первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с

10 модифицированным доменом СН3, имеющим белок-белковую контактную поверхность, при этом указанная белок-белковая контактная поверхность первого полипептида содержит аминокислотную замену в положении 20 и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90, и при этом указанная белок-белковая контактная поверхность второго полипептида содержит аминокислотную замену в

15 положении 26 и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 22, 27, 79, 81, 84, 85.1, 86 и 88, при этом указанный аминокислотный остаток, замененный в положении 20 в первой сконструированной константной области иммуноглобулина, взаимодействует с аминокислотным остатком, замененным в положении 26 во второй сконструированной константной области иммуноглобулина, при этом указанное аминокислотное положение

20 каждого члена группы указано в соответствии с нумерацией IMGT.

Предпочтительно аминокислотные остатки, которые заменены в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат аминокислотные остатки в положениях 20 и 22 и необязательно дополнительный аминокислотный остаток в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86,

25 88 и 90, и при этом указанные аминокислотные остатки, которые заменены в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат аминокислотные остатки в положении 26 и в другом положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90, при этом указанное аминокислотное положение каждого члена группы указано в соответствии с нумерацией

30 IMGT®.

Предпочтительно аминокислотные остатки, которые заменены в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат аминокислотные

остатки в положениях 20 и 22 и необязательно дополнительный аминокислотный остаток в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90, и при этом указанные аминокислотные остатки, которые заменены в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной цепи иммуноглобулина, содержат аминокислотные остатки в положениях 26 и 86 и необязательно в дополнительном положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 88 и 90, при этом указанное аминокислотное положение каждого члена группы указано в соответствии с нумерацией IMGT[®].

Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации аминокислотный остаток, который заменен в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 20, представляет собой 20K, и при этом указанный дополнительный аминокислотный остаток, замененный в белок-белковой контактной поверхности первой сконструированной константной области иммуноглобулина представляет собой 3A, 22V, 26T, 79Y, 85.IS, 86V, 88W и 90N, и при этом указанные аминокислотные остатки, которые заменены в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 26, представляют собой 26T, и при этом указанный дополнительный аминокислотный остаток, замененный в белок-белковой контактной поверхности второй сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 8ID, 84L, 84.2E, 84.4Q, 85.1C/S/A, 86S, 88R и 90R (нумерация IMGT[®]).

Согласно одному аспекту мультиспецифичное антитело или фрагмент указанного антитела согласно настоящему изобретению представляет собой гетеродимерный иммуноглобулин или его гетеродимерный фрагмент, причем указанный гетеродимерный иммуноглобулин или его гетеродимерный фрагмент содержит первую и вторую сконструированную цепь иммуноглобулина, при этом указанные первая и вторая цепи иммуноглобулина сконструированы с заменами аминокислот в белковой контактной поверхности, которые способствуют димеризации между первой и второй цепями иммуноглобулина, при этом указанная первая сконструированная цепь иммуноглобулина и указанная вторая сконструированная цепь иммуноглобулина не идентичны, и при этом каждый из указанных первого и второго сконструированных доменов содержит домен CH3, при этом указанные замены в сконструированных доменах происходят из эквивалентного положения во встречающемся в природе гетеродимере или гомодимере константного домена TCR, при этом

- указанные аминокислотные остатки, которые заменены в белок-белковой контактной поверхности первой и второй сконструированных цепей иммуноглобулина, содержат следующие аминокислотные остатки: (20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90) в первой сконструированной цепи иммуноглобулина и (3, 5, 7, 20, 22, 26, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88, 90) во второй сконструированной цепи иммуноглобулина; или (7, 20, 22, 27, 79, 81, 84.2, 85.1, 86, 88, 90) в первой сконструированной цепи иммуноглобулина и (3, 5, 20, 22, 26, 27, 81, 84, 85.1, 86, 88) во второй сконструированной цепи иммуноглобулина; при этом указанное аминокислотное положение каждого члена группы указано в соответствии с нумерацией IMGT®.
- 10 Согласно более конкретному варианту реализации первый сконструированный домен СН3 содержит замены в одном или более из следующих остатков 20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90 в соответствии с нумерацией IMGT, и при этом указанный второй сконструированный домен СН3 содержит замены по меньшей мере в одном остатке, выбранном из группы 3, 5, 20, 22, 26, 27, 81, 84, 85.1, 86, 88 в соответствии с нумерацией IMGT, и при этом указанный
- 15 гетеродимерный иммуноглобулин или гетеродимерный фрагмент гетеродимеризуются посредством указанных первого и второго сконструированных доменов СН3; более конкретно, первый сконструированный домен СН3 содержит замены из группы, состоящей из: S20K, T22V, K26T, K79Y, F85.1S, Y86V, K88W, T90N, и второй сконструированный домен СН3 содержит замены из группы, состоящей из: Q3E, Y5A, L7F, S20T, T22V, K26T,
- 20 T81D, V84L, D84.2E, F85.1A, Y86S, K88R, T90R. Согласно дополнительному варианту реализации второй сконструированный домен СН3 также содержит замену D84.4Q в соответствии с нумерацией IMGT.

- В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения мультиспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин присутствует в готовом для введения лекарственном
- 25 продукте согласно настоящему изобретению в концентрации от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 5 мг/мл, или от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 4 мг/мл, или от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 2 мг/мл, или от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 1 мг/мл, или от приблизительно 2 нг/мл до приблизительно 5 мг/мл, или от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 5 мг/мл, или от приблизительно 10 нг/мл до
- 30 приблизительно 5 мг/мл, или от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 4 мг/мл, или от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 2 мг/мл; например, концентрация готового для введения лекарственного продукта выбрана из группы, включающей приблизительно 1 нг/мл,

приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 150 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 250 нг/мл, приблизительно 300 нг/мл, приблизительно 350 нг/мл, приблизительно 400 нг/мл, приблизительно 450 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, приблизительно 550 нг/мл, приблизительно 600 нг/мл, приблизительно 650 нг/мл, приблизительно 700 нг/мл, приблизительно 750 нг/мл, приблизительно 800 нг/мл, приблизительно 850 нг/мл, приблизительно 900 нг/мл, приблизительно 950 нг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 1,2 мг/мл, приблизительно 1,4 мг/мл, приблизительно 1,6 мг/мл, приблизительно 1,8 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,2 мг/мл, приблизительно 2,4 мг/мл, приблизительно 2,6 мг/мл, приблизительно 2,8 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 3,2 мг/мл, приблизительно 3,4 мг/мл, приблизительно 3,6 мг/мл, приблизительно 3,8 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 4,2 мг/мл, приблизительно 4,4 мг/мл, приблизительно 4,6 мг/мл, приблизительно 4,8 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл. Согласно более конкретному варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела присутствуют в готовом для введения лекарственном продукте согласно настоящему изобретению в концентрации, составляющей от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 20 нг/мл, более конкретно, в концентрации, выбранной из группы, включающей приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 8 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 12 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 18 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл. Настоящее изобретение также включает антитело или фрагмент указанного антитела, присутствующий в раскрытом готовом для введения лекарственном продукте, в концентрации, которая представляет собой любое промежуточное значение между указанными выше значениями.

Согласно дополнительным аспектам настоящего изобретения мультиспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин или его гетеродимерный иммуноглобулин согласно настоящему изобретению связывается с первой мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b, второй мишенью, которая отличается от первой мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b, третьей мишенью, которая отличается от первой мишени или отличается от первой и второй мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA,

NKp30, CD16, CD16a и CD16b, и четвертой мишенью, которая отличается от первой мишени или отличается от первой и второй мишени, или отличается от первой, второй и третьей мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

5 Согласно другим аспектам настоящего изобретения мультиспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин или его гетеродимерный иммуноглобулин согласно настоящему изобретению связывается с первой мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b, второй мишенью, которая отличается от первой мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b, и третьей мишенью, которая отличается от первой мишени или отличается от первой и второй мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

15 Согласно определенным аспектам настоящего изобретения мультиспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин или его гетеродимерный иммуноглобулин согласно настоящему изобретению связывается с первой мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b, и второй мишенью, которая отличается от первой мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IgE, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно более конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD3 и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

25 Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с HER2 и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

30 Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD38 и по меньшей мере со

второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD3, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с EFGR и по меньшей мере со
5 второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, CD3, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD20 и по меньшей мере со
10 второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD3, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с OX40 и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, CD3, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

15 Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD19 и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD3, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или
20 фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD47 и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD3, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или
25 фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с IL1RAP и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, CD3, BMCA, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или
30 фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с BMCA и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, CD3, NKp30, CD16, CD16a и CD16b.

Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с NKp30 и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, CD3, CD16, CD16a и CD16b.

- 5 Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD16 и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD3, CD16a и CD16b.

- 10 Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD16a и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD3, CD16 и CD16b.

- 15 Согласно другому конкретному аспекту мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD16b и по меньшей мере со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30, CD3, CD16a и CD16.

Согласно конкретным вариантам реализации мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с CD3 и со второй мишенью, выбранной из группы, включающей HER2, CD38, EGFR.

- 20 Например, мультиспецифичное антитело в соответствии с настоящим изобретением может быть создано с помощью технологии BEAT[®] (WO2012131555).

Например, согласно настоящему изобретению предложен лекарственный продукт, содержащий биспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин, связывающийся с:

- 25 i) CD3 и HER2, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 12; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18, 19 и 20; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 21 и 22; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23, 24 и 15; или

- ii) CD3 и CD38, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, 14 и 26; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27, 28 и 29; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 30, 31 и 26; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24, 35 и 36; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24, 29 и 37; или
- iii) CD3 и OX40, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38, 39 и 14; или аминокислотные последовательности 40, 41 и 24; или аминокислотные последовательности 42, 43 и 24; или аминокислотные последовательности 44, 38 и 24; или
- iv) CD3 и EGFR, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45, 46 и 28; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 47, 48 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49, 50 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51, 52 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53, 54 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 55, 46 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 56, 57 и 24; или
- v) CD3 и CD20, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58, 59 и 31; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 60, 61 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64, 59 и 24; или
- vi) CD3 и CD19, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65, 66 и 24; или
- vii) CD3 и IgE, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 67, 68 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 69, 70 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 71, 72 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73, 74 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 75, 76 и 24; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 77, 78 и 24.

Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации биспецифичное антитело или фрагмент указанного антитела связывает первую мишень CD3 и вторую мишень, выбранную из группы, включающей HER2, CD38 и EGFR. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биспецифичное антитело, обозначаемое Ab1, связывает

кластер дифференцировки 3 (CD3), экспрессируемый Т-клетками, и рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), часто сверхэкспрессируемый в раковых клетках, таких как клетки рака молочной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака слюнных желез, рака эндометрия, рака поджелудочной железы и немелкоклеточного рака легких (НМРЛ). Ab1 в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3. Согласно другому варианту реализации моноклональное биспецифичное антитело представляет собой Ab2 (SEQ ID NO: 4-6), которое связывается с CD3 и EGFR, которые, как известно, являются мишенью при различных типах рака, включая колоректальный рак. Согласно одному варианту реализации биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению связывается с эпитопами на CD3 и CD38 (SEQ ID NO: 7-9). Согласно другому варианту реализации моноклональное биспецифичное антитело представляет собой Ab3, предназначенное для одновременного взаимодействия с молекулой CD3 на Т-клетках и антигеном CD38 на клетках множественной миеломы и, таким образом, соединения цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками множественной миеломы, уничтожая посредством этого связанные клетки-мишени. Этот процесс описывается как перенаправленное уничтожение или лизис.

Настоящее изобретение также относится к готовому для введения лекарственному продукту для применения при лечении пациента, нуждающегося в этом. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, нуждающегося в этом.

В настоящем документе термин «субъект» эквивалентен термину «пациент» и включает любого человека или животное, отличное от человека. Термин «животное, отличное от человека» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как нечеловекообразные приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, земноводные, рептилии и т.д. Предпочтительно субъект представляет собой человека.

Термин «лечение» или «осуществлять лечение» в настоящем изобретении включает терапевтическое лечение, а также меры профилактики или подавления заболевания или нарушения. Таким образом, например, успешное введение антитела до начала заболевания приводит к лечению заболевания. В качестве другого примера, успешное введение антитела после клинического проявления заболевания для борьбы с симптомами заболевания включает лечение заболевания. «Лечение» и «осуществлять лечение» также включает введение антитела после появления заболевания с целью устранения заболевания. Успешное

введение антитела после начала и после развития клинических симптомов, с возможным ослаблением клинических симптомов и, возможно, уменьшением заболевания, включает лечение заболевания. Те, кто «нуждается в лечении», включают вскармливающих, уже страдающих заболеванием или нарушением, а также тех, кто склонен к заболеванию или нарушению, включая тех, у которых заболевание или нарушение необходимо предотвратить.

Антитело согласно настоящему изобретению можно вводить в виде однократной дозы или многократных доз. Термины «доза» или «дозировка», используемые в настоящем изобретении, являются взаимозаменяемыми и обозначают количество лекарственного вещества, вводимого в расчете на массу тела субъекта, или общую дозу, вводимую субъекту, независимо от его массы тела.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения готовый для введения лекарственный продукт согласно настоящему изобретению может быть введен индивидуумам. Введение предпочтительно осуществляется в «терапевтически эффективном количестве», которого достаточно, чтобы принести пользу субъекту. Такой пользой может быть по меньшей мере уменьшение по меньшей мере одного симптома. Фактическое вводимое количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от характера и тяжести того, что лечат. Назначение лечения, например, решения о дозировке и т. д., входит в обязанности врачей. Подходящие дозы антитела хорошо известны в данной области техники (Ledermann JA et al., (1999) *Int J Cancer* 47: 659-664; Bagshawe KD et al., (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 4: 915-922). Точная доза будет зависеть от ряда факторов, включая размер и расположение области, подлежащей лечению, массу тела субъекта, точную природу антитела (например, цельное антитело или его фрагмент) и любых дополнительных терапевтических агентов, введенных до, во время или после введения антитела.

Настоящее изобретение также относится к способу изготовления разбавителя согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению также раскрыто промышленное изделие, содержащее разбавитель согласно настоящему изобретению.

Фигура 1: Стабильность Ab1 в разбавителях D1-D10 при T0 и через 1 месяц при 5°C, 25°C и 40°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 2: Извлечение Ab1 (нг/мл) для разбавителей D1-D10 после 24 часов инкубации в стеклянном флаконе и в наборе для введения с полиэтиленовым покрытием (инфузионный набор), первый цикл. Указана теоретическая концентрация («ожидаемая конц.»).

5 Фигура 3: Извлечение Ab1 (нг/мл) для разбавителей D5, D6, D7, D9 и D10 после 24 часов инкубации в стеклянном флаконе и в наборе для введения с полиэтиленовым покрытием (инфузионный набор), второй цикл. Указана теоретическая концентрация («ожидаемая конц.»).

10 Фигура 4: Стабильность Ab1 в разбавителе D1 при T0, после трех циклов замораживания-оттаивания (FT) от -80°C до 25°C и после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

15 Фигура 5: Стабильность Ab1 в разбавителе D1 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C и после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 6: Стабильность Ab1 в разбавителе D1 при T0, после трех циклов FT от -20°C до 25°C и после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

20 Фигура 7: Стабильность Ab1 в разбавителе D1 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -20°C до 25°C и после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

25 Фигура 8: Стабильность Ab1 в разбавителе D2 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C и после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

30 Фигура 9: Стабильность Ab1 в разбавителе D2 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -20°C до 25°C и после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 10: Стабильность Ab1 в разбавителе D3 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C и после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

- 5 Фигура 11: Стабильность Ab1 в разбавителе D5 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C и после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

- 10 Фигура 12: Стабильность Ab1 в разбавителе D3 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -20°C до 25°C и после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

- 15 Фигура 13: Стабильность Ab1 в разбавителе D5 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -20°C до 25°C и после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

- 20 Фигура 14: Стабильность Ab1 в разбавителе D8 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C и после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 15: Стабильность Ab1 в разбавителе D8 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -20°C до 25°C и после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

- 25 Фигура 16: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), при T0 и после одного цикла FT от -80°C до 25°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

- 30 Фигура 17: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), при T0 и после одного цикла FT от -20°C до 25°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 18: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), при T0 и через 24 часа или 1 неделю (1 нед.) инкубации при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм.

5 Фигура 19: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), при T0 и через 24 ч или 1 неделю инкубации при 25°C в темноте, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 20: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), при T0 и через 24 ч или 1 неделю инкубации при 25°C на свету, измеренная по поглощению при 280 нм.

10 Фигура 21: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), после 1 недели инкубации при 5°C в стеклянном флаконе объемом 100 мл, заполненном на 80% объема, в котором игла из нержавеющей стали помещена посередине («80% заполнение + иглы»), измеренная по поглощению при 280 нм.

15 Фигура 22: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), после 1 недели инкубации при 25°C в стеклянном флаконе объемом 100 мл, заполненном на 80% объема, в котором игла из нержавеющей стали помещена посередине («80% заполнение + иглы»), в темноте, измеренная по поглощению при 280 нм.

20 Фигура 23: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), после 1 недели инкубации при 25°C в стеклянном флаконе объемом 100 мл, заполненном на 80% объема, в котором игла из нержавеющей стали помещена посередине («80% заполнение + иглы»), на свету, измеренная по поглощению при 280 нм.

25 Фигура 24: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), после 1 недели инкубации при 5°C в стеклянном флаконе объемом 100 мл, полностью заполненном или заполненном на 80%, измеренная по поглощению при 280 нм.

30 Фигура 25: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), после 1 недели инкубации при 25°C в

стеклянном флаконе объемом 100 мл, полностью заполненном или заполненном на 80%, в темноте, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 26: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), после 1 недели инкубации при 25°C в шприце в стеклянном флаконе объемом 100 мл или заполненном на 80%, на свету, измеренная по поглощению при 280 нм.

Фигура 27: Стабильность Ab1 в разбавителе D1, содержащем Tween 80-1 (Tween 1) или Tween 80-2 (Tween 2), или Tween 80-3 (Tween 3), после 1 недели инкубации при 25°C в темноте и при комнатном освещении, измеренная по поглощению при 280 нм.

10 Фигура 28: Результаты количественного определения методом ИФА (исследование 1).

Фигура 29: Результаты количественного определения методом ИФА (исследование 2).

Фигура 30: Результаты количественного определения методом ИФА (исследование 3).

Пример 1: Исследование стабильности Ab1 в разбавителях D1-D10

Материалы и методы

15 Сначала изучали стабильность Ab1, биспецифичного антитела к CD3xHER2, в разбавителях D1-D10 (показанных в Таблице 1) при различных стрессовых условиях. Ab1 присутствовало в указанных разбавителях в концентрации 10 нг/мл.

Разбавитель	Композиция			
D1	25 мМ гистидина	- 100 мМ аргинина	- 0,05% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,4
D2	25 мМ гистидина	- 100 мМ аргинина	- 0,05% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,0
D3	25 мМ триса	- 100 мМ аргинина	- 0,05% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,4
D4	25 мМ триса	- 100 мМ аргинина	- 0,05% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,0
D5	25 мМ фосфата	- 100 мМ аргинина	- 0,05% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,4
D6	25 мМ	- 100 мМ аргинина	- 0,05% (масс./об.)	- pH 7,0

	фосфата	полисорбата 80
D7	Лимонная кислота 210 мг/л - NaCl 9,0 г/л - лизин-HCl 9,1 г/л - полисорбат 80 0,04 г/л (0,004%) – $6,6 \leq \text{pH} \leq 7$	
D8	25 mM - 100 mM аргинина гистидина	0,004% (масс./об.) полисорбата 80 - pH 7,0
D9	25 mM - 100 mM аргинина триса	0,004% (масс./об.) полисорбата 80 - pH 7,0
D10	25 mM - 100 mM аргинина фосфата	0,004% (масс./об.) полисорбата 80 - pH 7,0

Таблица 1. Композиция разбавителей D1-D10

Образцы, не подвергнутые стрессу, анализировали непосредственно в момент времени T0 после получения материала, чтобы иметь контроль для сравнения с образцами, подвергнутыми стрессу. Изучаемые стрессовые состояния включают:

- 5 - Температурный стресс: целью температурного стресса является оценка влияния каждой температуры на молекулярные свойства Ab1. В данном случае изучали 1 месяц (1M) инкубации при $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и $40 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 10 - Стресс при замораживании/оттаивании (FT): Исследования FT и времени хранения выполняли в различных условиях, включая 1, 2 или 3 цикла FT от -20°C или от -80°C до 25°C , и 1 или 3 цикла FT от -20°C или от -80°C до 25°C с последующей инкубацией при 5°C или при 25°C в течение 24 или 48 часов.

Для этих экспериментов в D1-D10 использовали Tween 80 в виде полисорбата 80. Изучали влияние различных типов полисорбата 80, в частности, различных типов Tween 80, на стабильность Ab1, а также влияние контакта с металлическими иглами, объема заполнения 15 стеклянного флакона и условий освещения/темноты.

Чтобы установить стабильность молекулы в описанных условиях общую концентрацию белка измеряли спектрофотометром в УФ-видимом диапазоне с использованием оборудования Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Результаты и выводы

Исследование стабильности в течение одного месяца

Сначала изучали стабильность Ab1 в разбавителях D1-D10 до хранения (T0) и после 1 месяца хранения при 5°C, при 25°C и при 40°C. На основании результатов, полученных путем измерения A280, разбавители D5-D10 оказались наиболее стабильными с A280 ниже предела в 0,15, установленного спецификацией (измеренное значение 0,15 установлено как значение отсечки, поскольку значения $\geq 0,15$ начинают мешать измерению фактического содержания белка) для всех испытанных температур, за исключением хранения D8 при 40°C, что привело к значению A280, которое немного превышало предел спецификации (данные показаны на Фигуре 1).

Исследование извлечения

Извлечение Ab1 при разведении 8 нг/мл в разбавителях D1-D10 исследовали после его хранения в стеклянном флаконе и в наборе для введения с полиэтиленовым покрытием в течение 24 часов. Результаты, показанные на Фигуре 2 и Фигуре 3, указывают на то, что извлечение является сходным для большинства испытанных буферов, тем не менее, D7 и D10 дают наиболее стабильные результаты среди различных буферов. Разбавители считались приемлемыми, если они соответствовали пределам $\pm 40\%/50\%$ от целевого значения при самой низкой концентрации.

Стресс путем замораживания-оттаивания

Результаты анализа стабильности Ab1, полученные после применения стресса путем замораживания-оттаивания (FT), приведены на Фигурах 4-15. Чтобы изучить влияние температуры FT для разбавителей D1 и D7 выполняли FT от -80°C до 25°C и от -20°C до 25°C. В частности, на Фигурах 4-7 показаны результаты, полученные для D1. Более конкретно, на Фигуре 4 показана стабильность Ab1 в разбавителе D1 при T0, после трех циклов FT от -80°C до 25°C и после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм на спектрофотометре. На Фигуре 5 показана стабильность Ab1 в разбавителе D1 до (T0) и после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C, а также после трех циклов FT от -80°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или при 5°C, измеренная с помощью Nanodrop. На Фигуре 6 показана стабильность Ab1 в разбавителе D1 при T0, после трех

циклов FT от -20°C до 25°C и после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C, измеренная по поглощению при 280 нм на спектрофотометре. На Фигуре 7 показана стабильность Ab1 в разбавителе D1 при T0 и после одного, двух или трех циклов FT от -20°C до 25°C, а также после трех циклов FT от -20°C до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или 5°C, измеренная с помощью спектроскопии по A280 или с помощью Nanodrop.

Затем изучали влияние pH на стабильность Ab1 с помощью исследований FT D2. На Фигуре 8 и Фигуре 9 показана стабильность Ab1 в разбавителе D2 при T0 и после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C и от -20°C до 25°C, соответственно, а также после трех циклов FT от -80°C (или -20°C) до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 5°C.

Сходный эксперимент выполняли с разбавителями D3 и D5 для изучения влияния типа буфера (см. Фигуру 10 и Фигуру 12, где приведены результаты, полученные для D3, и Фигуру 11 и Фигуру 13, где приведены результаты, полученные для D5). На Фигуре 14 и Фигуре 15 показана оценка влияния концентрации полисорбата 80, результаты были получены для D8 при T0, после одного, двух или трех циклов FT от -80°C до 25°C и от -20°C до 25°C, соответственно, а также после трех циклов FT от -80°C (или -20°C) до 25°C с последующей 24-часовой или 48-часовой инкубацией при 25°C или при 5°C.

На основании сравнения исследований FT, выполненных для D1, D2, D3, D5 и D8, можно сделать вывод, что температура замораживания (т.е. -20°C или -80°C) оказывает незначительное влияние на разрушение антитела. Тип буфера влияет на стабильность антитела, фактически, при сравнении профилей разрушения D1 (буфер: гистидин), D3 (буфер: трис) и D5 (буфер: фосфат) становится ясно, что при использовании фосфата достигается более высокая стабильность. Иными словами, pH разбавителя не влияет на профиль разрушения антител, как показывают результаты, полученные для D1, имеющего pH 7,4 (Фигура 5 и Фигура 7) и для D2, имеющего pH 7,0 (Фигура 8 и Фигура 9).

Влияние типа Tween

Затем изучали влияние типа полисорбата 80 на стабильность Ab1, разведенного в D1 в стеклянном флаконе на 100 мл (заполненном на 80%). В частности, испытывали Tween 80-1, Tween 80-2 и Tween 80-3. Сначала испытали влияние полисорбата 80 до и после 1 цикла FT

от -80°C до 25°C (Фигура 16) и после одного цикла FT от -20°C до 25°C (Фигура 17), при этом в целом не наблюдали существенной разницы между испытанными Tween 80. Затем изучали хранение при 5°C в течение 24 часов и в течение 1 недели (1 нед.) (Фигура 18) и показали нестабильность антитела после 1 недели хранения при использовании Tween 1 и Tween 2. Сходные результаты получали после инкубации образца при 25°C в течение 24 часов и в течение 1 недели (1 нед.) как в условиях темноты (Фигура 19), так и при освещении (Фигура 20).

Влияние металла

Кроме того, исследовали влияние металла на стабильность Ab1, разведенного в D1, содержащем Tween 80-1 или Tween 80-2, или Tween 80-3. В частности, стеклянный флакон объемом 100 мл заполняли на 80% объема, в середину флакона помещали набор из пяти игл из нержавеющей стали и оценивали стабильность антитела после одной недели инкубации при 5°C (Фигура 21) и при 25°C в темноте (Фигура 22) или в условиях освещения (Фигура 23). Как демонстрируют результаты на Фигуре 21-Фигуре 23, присутствие игл не влияет на стабильность Ab1.

Влияние объема заполнения

Кроме того, изучали влияние процента заполнения флакона на стабильность Ab1 в D1, содержащем Tween 80-1 или Tween 80-2, или Tween 80-3. В частности, стеклянный флакон объемом 100 мл заполняли полностью (Maxfill), исключая таким образом присутствие воздуха, или заполняли на 80% объема и оценивали стабильность антитела через неделю инкубации при 5°C (Фигура 24) и при 25°C в темноте (Фигура 25) или в условиях освещения (Фигура 26). Результаты этого исследования показали, что объем заполнения влияет на стабильность Ab1 только при использовании Tween 80-1 или Tween 80-2 в качестве полисорбата 80.

Влияние света

Сравнение результатов, полученных после инкубации Ab1 при 25°C в течение 1 недели на свету или в темноте, демонстрирует, что свет не влияет на стабильность Ab1 (Фигура 27).

Пример 2: Исследование стабильности Ab2 в разбавителях C1-C18

Ab2 представляет собой биспецифичное антитело к EGFRxCD3, которое нацелено на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), доказанную мишень при нескольких видах

рака, включая плоскоклеточную карциному головы и шеи и колоректальный рак. В низкой концентрации, такой как 10 нг/мл, белки склонны к адсорбции на различных поверхностях, включая систему для инфузии (пакет, катетер, фильтр и т. д.). Для ограничения потерь при адсорбции требуется композиция разбавителя с соответствующим вспомогательным
5 веществом. В этой разработке испытывали различные композиции разбавителей для извлечения Ab2.

Материалы и методы

Композиция испытанных разбавителей (от C1 до C18) приведена в Таблице 2.

Разбавитель	Композиция			
C1	25 мМ цитрата ^a	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,0
C2	25 мМ цитрата ^a	- 500 мМ L-лизина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,0
C3	25 мМ цитрата ^a	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,5
C4	25 мМ цитрата ^a	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,0
C5	25 мМ гистидина ^b	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,0
C6	25 мМ гистидина ^b	- 500 мМ L-лизина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,0
C7	25 мМ гистидина ^b	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,5
C8	25 мМ гистидина ^b	- 500 мМ L-лизина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,5
C9	25 мМ фосфата ^c	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,0
C10	25 мМ фосфата ^c	- 500 мМ L-лизина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,0
C11	25 мМ фосфата ^c	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,5
C12	25 мМ фосфата ^c	- 500 мМ L-лизина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,5
C13	25 мМ фосфата ^c	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,0
C14	25 мМ фосфата ^c	- 500 мМ L-лизина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 7,0
C15	25 мМ цитрата- фосфата ^d	- 500 мМ L-аргинина-HCl	- 0,04% (масс./об.) полисорбата 80	- pH 6,0
C16	25 мМ цитрата-	- 500 мМ L-лизина-HCl	- 0,04% (масс./об.)	- pH

	фосфата ^d	полисорбата 80	6,0
C17	25 мМ цитрата- фосфата ^e - 500 мМ L-аргинина-HCl -	0,04% (масс./об.) полисорбата 80	pH - 7,0
C18	25 мМ цитрата- фосфата ^e - 500 мМ L-лизина-HCl -	0,04% (масс./об.) полисорбата 80	pH - 7,0

Таблица 2. Перечень испытанных специализированных разбавителей. ^aПриготовлено с использованием лимонной кислоты и дигидрата трехзамещенного цитрата натрия

^bПриготовлено с использованием L-гистидина и моногидрохлорида L-гистидина.

^cПриготовлено с использованием одноосновного фосфата натрия и двухосновного фосфата

5 натрия. ^dПриготовлено с использованием цитратного буфера и фосфатного буфера (соотношение 2:1)

^eПриготовлено с использованием цитратного буфера и фосфатного буфера (соотношение 1:2).

Материалы, которые будут использоваться в клинических исследования для внутривенного
10 (в/в) пути введения, включают шприцы (50 мл), иглы (23G), наборы для инфузий, трехходовой запорный кран и специализированный разбавитель (буфер). Для исследования совместимости с в/в введением готовили различные разведения Ab2 и вносили либо в пробирки Falcon объемом 50 мл (исследование 1 и 2), либо в пакеты с физиологическим раствором (исследование 3, 4 и 5); образцы T0 отбирали непосредственно из пробирок Falcon
15 (исследование 1 и 2) или из пакетов с физиологическим раствором (исследование 3, 4 и 5) с использованием свежего шприца на 3 мл и иглы 18G; их хранили при 25±2°C до 24 часов. Затем образцы из пробирки Falcon использовали для анализа (исследование 1 и 2) или устанавливали инфузионный катетер (с иглой – 23G) и производили медленную инъекцию в пустой стеклянный флакон и использовали для анализа. Обобщенная информация об
20 исследованиях приведена в Таблице 3.

Изделие	Описание	Исследование
Пакет для инъекции	500 мл 0,9% хлорида натрия Viaflex	3 и 4
	500 мл 0,9% хлорида натрия Escobag [®]	5
Набор для инфузии	Набор Infusomat Space Pump IV	3 и 4
	Волюметрический насос с фильтром 15 мкм Alaris [®] VP	5

3-ходовой запорный кран	Discofix [®]	3 и 4
	BD Connecta [™]	5
Игла	Игла 23G Microlance [™] 3 BD	3, 4 и 5
Шприц	Шприц 1 мл Luer-Lok [™] BD	3, 4 и 5
	Шприц 3 мл Luer-Lok [™] BD	3, 4 и 5
	Шприц 60 мл PlastiPak [™] BD	3, 4 и 5

Таблица 3. Перечень материалов инфузионного набора, использованных для разработки специализированного разбавителя Ab2

Для исследования совместимости в пробирках Falcon (исследования 1 и 2) Ab2 разводили в разбавителях от C1 до C18 до целевой концентрации 10 нг/мл. Для исследования совместимости в пакетах с физиологическим раствором (исследования 3, 4 и 5) для приготовления образцов последовательно выполняли следующие этапы:

1. Нерасфасованное лекарственное вещество Ab2 (BDS) разбавляли до 0,10 мг/мл во флаконе, и пакеты с физиологическим раствором выдерживали при комнатной температуре в течение как минимум 2 часов для уравнивания до комнатной температуры.

2. Флаконы промывали водой высокой степени очистки (ВЧВ) и сушили при комнатной температуре. Промытые пустые флаконы автоклавировали с использованием паровой стерилизации и сушили. Промытые и автоклавированные флаконы использовали для сбора образцов для количественного определения методом ИФА.

3. Разбавители готовили в соответствии с композициями из Таблицы 2.

4. Приготовленные буферы фильтровали с использованием фильтра с размером пор 0,22 мкм под вытяжным шкафом с ламинарным воздушным потоком (LAF) в стерильный стеклянный сосуд объемом 1 л (Schott), соответствующим образом маркировали и хранили при 5±3°C до использования.

5. Для каждого разбавителя брали иглу 18G и шприц на 60 мл и из каждого пакета отбирали 55 мл физиологического раствора. Эти 55 мл физиологического раствора затем выбрасывали.

6. С помощью другой иглы 18G и шприца на 60 мл добавляли 55 мл специализированного разбавителя в пакет с физиологическим раствором (из которого уже было удалено 55 мл физиологического раствора).

7. Во флаконы, содержащие Ab2 при 0,1 мг/мл, добавляли 0,9 мл разбавителя, при этом объем увеличивался с 1,1 мл до 2,0 мл с последующим снижением концентрации с 0,1 мг/мл до 0,055 мг/мл.

8. Однократное разведение Ab2 готовили, как указано в общем виде в Таблице 4.

Целевая концентрация Ab2	Концентрация лекарственного продукта Ab2	Концентрация Ab2 во флаконе после добавления разбавителя	Разведение (в пакете с физиологическим раствором)	
			Ab2 из размороженного флакона с разбавленным содержимым	Объем подготовленного пакета
нг/мл	мг/мл	мкг/мл	мл	мл
10	0,1	55	0,1	550*

10 Таблица 4. Схема приготовления (разбавления) образцов (в/в). *Пакеты объемом 500 мл обычно переполняют на 5-10%, чтобы обеспечить заливку и т. д. Расчет сделан с учетом объема 550 мл.

9. В ходе этого исследования испытывали различные условия, представленные в Таблице 5.

15

	Исследование 3				Исследование 4		Исследование 5				Повторное испытание для исследования 5	
Разбавитель	T0 25°C (пакет)	T0 25°C (катетер)	T24 25°C (пакет)	T24 25°C (катетер)	T0 25°C	T24 25°C	T0 5°C	T24 5°C	T0 25°C	T24 25°C	T0 25°C	T24 25°C

C8	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	X	X	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
C9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X*	X*
C11	X	X	X	X	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
C12	X	X	X	X	X	X	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
C17	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	X	X	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Цитратный разбавитель (D7)	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	X	X	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И

Таблица 5. Обобщенные данные по испытанным условиям: X: Испытано; Н/И: Не испытано;
*Исследование 5 было повторно испытано с использованием 5 повторов каждого условия, поэтому Ab2 было разведено в 5 пакетах.

- 5 10. После инкубации пакеты удаляли и подсоединяли инфузионный катетер. В исследовании 3 катетер подсоединяли также при T0 для исследования адсорбции после инкубации при $+25\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 часов как в катетере, так и в пакете.
- 10 11. Инфузионный катетер заполняли и отбрасывали первые 30 мл, после чего образец собирали в стеклянные флаконы. Приблизительно 1 мл образца собирали в стеклянные флаконы и использовали для количественного определения методом ИФА (подробности см. в Таблице 6 и в описании ниже).
12. Все образцы (T0 и после инкубации) анализировали в один и тот же момент времени во время каждого исследования.

Тип анализа	Параметр	Спецификации
Количественное определение методом ИФА	Концентрация белка	5-15 нг/мл

15 Таблица 6. Метод испытания и спецификация, использованные для разработки специализированного разбавителя Ab2

Метод ИФА разрабатывали для количественного определения испытываемого белка. Далее выполняют следующие этапы: 1) покрытие выполняют путем добавления 100 мкл 10 мкг/мл мишени антитела (1-26 N-концевой пептид FC человеческого CD3) на 96-луночный планшет

Costar. После добавления мишени антитела планшет инкубируют при 2-8°C в течение ночи. 2) на следующее утро планшет промывали 200 мкл ФСБ с 0,01% Tween 20 с помощью устройства для промывки планшетов, затем добавляли 200 мкл блокирующего буфера (2% БСА в ФСБ) и инкубировали 90±30 мин при 37°C±2°C. 3) После инкубации блокирующий буфер удаляли и планшет промывали 200 мкл ФСБ с 0,01% Tween 20 с использованием устройства для промывки планшетов. Затем в планшет добавляли образцы и референсный стандарт (известная концентрация) (100 мкл). Планшет далее инкубировали при 37°C±2°C в течение 60±5 минут. 4) После инкубации планшет промывали 200 мкл ФСБ с 0,01% Tween 20 и добавляли в планшет детектирующее антитело. Планшет инкубировали при 37°C±2°C в течение дополнительных 60±5 минут. 5) Наконец, планшет промывали 200 мкл ФСБ с 0,01% Tween 20 и проявляли добавлением субстрата ТМВ для пероксидазы из набора для ЕІА. Реакцию останавливали через 10 мин, добавляя 50 мкл 1 М раствора H₂SO₄, и планшет считывали с помощью УФ-спектрофотометра.

Результаты и обсуждение

15 Исследование 1

Цель исследования 1 заключалась в скрининге разбавителей из Таблицы 2 для выбора наиболее перспективных для последующих исследований. В этом исследовании Ab2 разбавляли до целевой концентрации 10 нг/мл в 18 буферных композициях, перечисленных в Таблице 2. Анализ извлечения выполняли с использованием количественного определения методом ИФА, как описано выше.

Анализировали 18 разбавителей. Данные показали матричную несовместимость (происходящую из-за отсутствия правильной S-кривой с верхней асимптотой, нижней асимптотой и линейными точками - возможной основной причиной этого является различие в композиции и типе буфера, приводящее к матричному эффекту. Этот матричный эффект затрудняет интерпретацию данных для образцов) для 8 разбавителей (C1, C2, C5, C6, C7, C10, C13 и C15). Для 10 других, по-видимому, условия были неоптимальными по сравнению с блокирующим буфером, поэтому их повторяли до 5 нг/мл и более высокого разведения Strep-HRP. Результаты представлены на Фигуре 28.

На основании данных, представленных на Фигуре 28, был сделан дополнительный отбор разбавителей для испытания в исследовании 2. Разбавители, включенные в окончательный перечень Фигуры 28, ранжировали на основании трех критериев:

- Шум во время анализа;
- Связывание (или извлечение) Ab2;
- Точность (или близость) наблюдаемого значения относительно целевого значения. В каждом случае среднее значение T0 и T24 сравнивали с целевым значением 10 нг/мл, затем применяли ранжирование (Таблица 7).

5

Разбавитель	Фоновый шум (ед.погл.)	Данные по связыванию белка (нг/мл)			Ранг			
		T0	T24	Изменение (%)	Шум	Связывание	Точность	Среднее
C3	0,5	9,9	4,5	54,55	2	3	1	2,00
C4	1	4,6	5,5	-19,57	3	Н/П	1	2,00
C8	0,6	11,4	11,6	-1,75	3	1	1	1,67
C9	0,3	9,2	13,8	-50,00	2	Н/П	1	1,50
C11	0,2	6,2	8,5	-37,10	2	Н/П	1	1,50
C12	0,4	10	10	0,00	2	1	1	1,33
C14	0,12	22	23,8	-8,18	2	Н/П	2	2,00
C16	0,12	19,4	18,5	4,64	2	1	2	1,67
C17	0,09	23,2	18,3	21,12	1	2	2	1,67
C18	0,1	81,1	89,1	-9,86	1	Н/П	3	2,00

Таблица 7. Ранжирование отобранных разбавителей после исследования 1. Н/П: Не применимо, так как значения T24 были выше, чем T0, и, следовательно, не учитывались при расчете среднего рангового значения.

10

На основании приведенного выше ранжирования для дальнейшего скрининга отобрали 4 разбавителя C9, C11, C12 и C14.

Исследование 2

В этом исследовании испытывали четыре отобранных разбавителя (C9, C11, C12 и C14) и D7 (см. Таблицу 1), названный контролем «Ctrl» на Фигуре 29 и в Таблице 8. При первой попытке анализа образцы оказались близкими к плато кривой, что привело к высокой

15

вариабельности измеренных концентраций, поэтому образцы разбавляли в 10 раз, чтобы оказаться в центре линейной части кривой.

Разбавитель	Спецификация	Первая попытка		Окончательные результаты после разведения 1/10	
		Целевая концентрация: 10 нг/мл			
		T0	24 часа при 25±2°C	T0	24 часа при 25±2°C
C9	5-15 нг/мл	13	12	11	10
C11	5-15 нг/мл	13	20	10	11
C12	5-15 нг/мл	11	16	11	9
C14	5-15 нг/мл	20	6	10	9
D7	5-15 нг/мл	7	6	10	10

Таблица 8. Результаты количественного определения методом ИФА в исследовании 2

5

На основании имеющихся данных было обнаружено, что все результаты извлечения находятся в пределах заранее указанных спецификаций (≥ 5 и ≤ 15 нг/мл). Было обнаружено, что Ab2 совместим с испытываемым инфузионным набором при разбавлении до 10 нг/мл в C9, C11, C12, C14 и D7.

10 Исследование 3

Целью этого исследования было испытание совместимости Ab2 с инфузионным набором (Таблица 3) при разбавлении до 10 нг/мл в разбавителях C9, C11 и C12, Таблица 9 и Фигура 30.

Разбавитель	Спецификация	Время инкубации			
		Целевая концентрация: 10 нг/мл			
		T0 (из пакета)	T0 (из катетера)	24 часа при 25±2°C (из пакета)	24 часа при 25±2°C (из катетера)
C9	5-15 нг/мл	5	7	6	7
C11	5-15 нг/мл	13	13	13	13
C12	5-15 нг/мл	13	10	12	11

Таблица 9. Результаты количественного определения методом ИФА в исследовании 3

На основании имеющихся данных было обнаружено, что все результаты по извлечению находятся в пределах заранее указанных спецификаций (≥ 5 и ≤ 15 нг/мл). Было обнаружено, что Ab2 совместим с испытываемым инфузионным набором при разбавлении до 10 нг/мл в C9, C11 и C12.

Исследование 4

Целью данного исследования было испытание совместимости двух разбавителей C9 и C12, выбранных из исследования 3, и двух разбавителей C8 и C17, от которых отказались после исследования 1 из-за их потенциальной матричной несовместимости с методом. D7 также использовали в качестве контроля перед анализом, все образцы разбавляли в блокирующем буфере так, чтобы они достигали одинакового поглощения при 450 нм (ось Y).

Разбавитель	Спецификация	Время инкубации	
		Целевая концентрация: 10 нг/мл	
		T0	24 часа при 25±2°C
C8	5-15 нг/мл	8	7
C9	5-15 нг/мл	7	7
C12	5-15 нг/мл	8	6
C17	5-15 нг/мл	8	7
D7	5-15 нг/мл	7	7

Таблица 10. Результаты количественного определения методом ИФА в исследовании 4

На основании имеющихся данных было обнаружено, что все результаты по извлечению находятся в пределах заранее указанных спецификаций (≥ 5 и ≤ 15 нг/мл). Было обнаружено, что Ab2 совместим с испытываемым инфузионным набором при разбавлении до 10 нг/мл в C8, C9, C12, C17 и цитратном разбавителе (D7).

5 Исследование 5

Целью этого исследования было испытание совместимости Ab2 с инфузионным набором (Таблица 3) при разбавлении до 10 нг/мл в отобранном разбавителе C9 и в D7.

Разбавитель	Спецификация	Время инкубации			
		Целевая концентрация: 10 нг/мл			
		T0 ($5\pm 3^\circ\text{C}$)	T24 ($5\pm 3^\circ\text{C}$)	T0 ($25\pm 2^\circ\text{C}$)	T24 ($25\pm 2^\circ\text{C}$)
C9	5-15 нг/мл	2	3	2	2
D7	5-15 нг/мл	6	7	6	6

Таблица 11. Результаты количественного определения методом ИФА в исследовании 5

- 10 На основании имеющихся данных было обнаружено, что результаты по извлечению находятся в пределах заранее указанных спецификаций (целевая концентрация $\pm 50\%$, т.е. ≥ 5 и ≤ 15 нг/мл) для D7, но не для разбавителя C9. Следовательно, было обнаружено, что Ab2 совместим с испытываемым инфузионным набором (Таблица 3) при разбавлении до 10 нг/мл в цитратном разбавителе (D7) и, по-видимому, несовместим с инфузионным набором при
- 15 разбавлении до 10 нг/мл в разбавителе C9. Это наблюдение было подтверждено повторным испытанием разбавителя C9, как указано ниже.

Исследование 5 (повторное испытание в условиях $+5\pm 3^\circ\text{C}$)

- На основании предыдущих результатов повторно испытывали условие $+5\pm 3^\circ\text{C}$. Ab2 разбавляли до 10 нг/мл в 5 отдельных пакетах (Таблица 3) и образцы при T0 и после
- 20 инкубации (24 часа при $+5\pm 3^\circ\text{C}$) анализировали с помощью количественного определения методом ИФА. Все результаты представлены в Таблице 12.

Код специализированного разбавителя	Спецификация	Время инкубации	
		Целевая концентрация: 10 нг/мл	
		T0 ($5\pm 3^\circ\text{C}$)	T24 ($5\pm 3^\circ\text{C}$)

С9 - повтор № 1	5-15 нг/мл	8	7
С9 - повтор № 2	5-15 нг/мл	13	7
С9 - повтор № 3	5-15 нг/мл	9	8
С9 - повтор № 4	5-15 нг/мл	9	10
С9 - повтор № 5	5-15 нг/мл	9	10

Таблица 12. Результаты количественного определения методом ИФА в исследовании 5 (повторное испытание)

На основании имеющихся данных было обнаружено, что все результаты по извлечению находятся в пределах заранее указанных спецификаций (≥ 5 и ≤ 15 нг/мл). Было обнаружено, что Ab2 совместим с испытываемым инфузионным набором (Таблица 3) при разбавлении до 10 нг/мл в С9.

В заключение, основываясь на данных по извлечению, по-видимому, два разбавителя были оптимальными для Ab2 при разбавлении до 10 нг/мл и через 24 часа инкубации как при $+5\pm 3^\circ\text{C}$, так и при $+25\pm 2^\circ\text{C}$ в инфузионных пакетах. Два оптимальных буфера приведены далее:

- Лимонная кислота 2,1 г/л, хлорид натрия 9,0 г/л, моногидрохлорид L-лизина 91,0 г/л, полисорбат 80 0,4 г/л (0,04%), pH 7,0 (D7).
- 25 мМ фосфата, 500 мМ моногидрохлорида L-аргинина, полисорбат 80 0,4 г/л (0,04%), pH 6,0 (C9).

Было обнаружено, что D7 является оптимальным с точки зрения защиты от потерь из-за адсорбции, а также стабильности буферной композиции.

Было обнаружено, что С9 является оптимальным с точки зрения защиты от потерь из-за адсорбции и стабильности, как показано в примере 3.

Пример 3: Исследования стабильности Ab2 – долгосрочное хранение

Целью данных экспериментов была оценка стабильности Ab2 в разбавителях C3, C4, C7, C8, C9, C11, C12, C14, C16, C17, C18 при хранении при $+5\pm 3^\circ\text{C}$, при $+25\pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40\pm 2^\circ\text{C}$. На основании данных о стабильности в течение 3 месяцев отобрали три разбавителя для дальнейшей оценки стабильности на протяжении до 29 месяцев.

Материалы и методы

Долгосрочную стабильность оценивали путем мониторинга изменения pH, оценки внешнего вида образца и измерения содержания белка (путем измерения поглощения при длине волны 280 нм (A_{280})), осмоляльности образца и выполнения анализа невидимых частиц с использованием метода светотени, рекомендованного согласно USP <787>, или с использованием сходного подхода с помощью прибора для визуализации микропотоков. В обоих случаях основной используемый принцип заключался в том, что присутствие частиц приводит к блокировке пути света, что используется для измерения размера и количества частиц.

- Полученные значения сравнивали со значениями, установленными спецификацией, которые считаются обеспечивающими стабильность образца. Для pH были установлены строгие спецификации (обычно целевое значение $\pm 0,1$ единицы), и предполагалось использовать этот анализ в качестве чувствительной меры любого разрушения буферных компонентов. Для испытания внешнего вида применяли стандартную спецификацию, применимую в биофармацевтической промышленности. Для невидимых частиц использовали спецификации из USP <787>, в то время как в оставшихся тестах в качестве спецификации на данный момент использовали только «отчет о результатах», поскольку испытания требуют основанных на данных спецификаций, тем не менее, они по-прежнему оцениваются на предмет их изменения по сравнению с T0.

20 Результаты и выводы

C3 – 3 месяца хранения при $+5\pm 3^\circ\text{C}$, при $+25\pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40\pm 2^\circ\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификации	Время инкубации при $+5\pm 3^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0\pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,4$ и $\leq 6,6$)	6,5	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	24,7	20,3	33,4
A_{280}	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,034	0,045	0,037

Осмоляльно сть	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	846	883	873
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 115 ≥ 25 мкм: 20	≥ 10 мкм: 40 ≥ 25 мкм: 5	≥ 10 мкм: 160 ≥ 25 мкм: 13
Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,4$ и $\leq 6,6$)	6,5	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачна я, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропро водность	Отчет о результатах (в мСм/см)	24,7	25,8	32,6
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,034	0,043	0,035
Осмоляльно сть	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	846	881	872
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 115 ≥ 25 мкм: 20	≥ 10 мкм: 55 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 53 ≥ 25 мкм: 3
Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,4$ и $\leq 6,6$)	6,5	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачна я, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропро	Отчет о результатах (в мСм/см)	24,7	26,6	31,0

водность				
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,034	0,044	0,036
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	846	884	853
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 115 ≥25 мкм: 20	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 237 ≥25 мкм: 13

Таблица 13: Исследование стабильности С3: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель С3 стабилен при хранении при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значения pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80.

10 С4 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Испытания стабильность и	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,9 и ≤7,1)	7,0	7,1	7,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	15,1	7,4	33,5
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,035	0,039	0,036
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	861	890	870

Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 85 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 5	≥ 10 мкм: 157 ≥ 25 мкм: 0
Испытания стабильност и	Спецификация	Время инкубации при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,9$ и $\leq 7,1$)	7,0	7,1	7,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачна я, бесцветна я	Прозрачна я, бесцветна я	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	15,1	21,7	33,0
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,035	0,040	0,034
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	861	891	876
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 85 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 60 ≥ 25 мкм: 35	≥ 10 мкм: 87 ≥ 25 мкм: 0
Испытания стабильност и	Спецификация	Время инкубации при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,9$ и $\leq 7,1$)	7,0	7,1	7,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачна я, бесцветна я	Прозрачна я, бесцветна я	Прозрачная, бесцветная

Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	15,1	21,2	32,1
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,035	0,042	0,038
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	861	890	880
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 85 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 10 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 210 ≥25 мкм: 20

Таблица 14: Исследование стабильности С4: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель С4 стабилен при хранении при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значение рН, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80.

10 С7 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		T0	T1M	T3M
рН	рН при T0±0,1 (т. е. ≥6,4 и ≤6,6)	6,5	6,6	6,5
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	15,9	24,4	30,8
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,039	0,043	0,145
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	823	839	831

ть				
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,03
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 130 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 25 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 110 ≥ 25 мкм: 3
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,4$ и $\leq 6,6$)	6,5	6,5	6,5
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	15,9	18,5	30,8
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,039	0,199	0,232
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	823	831	856
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,03	0,03
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 130 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 25 ≥ 25 мкм: 10	≥ 10 мкм: 103 ≥ 25 мкм: 7
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,4$ и $\leq 6,6$)	6,5	6,5	6,5
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, слегка желтоватая	Прозрачная, слегка желтоватая

			я	
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	15,9	19,7	29,3
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,039	0,231	0,232
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	823	844	824
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,02	0,03
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 130 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 50 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 10 ≥25 мкм: 0

Таблица 15: Исследование стабильности С7: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

- Было обнаружено, что разбавитель С7 нестабилен при хранении при +5±3°C до 3 месяцев, а также при +25±2 °C и +40±2 °C до 1 месяца, поскольку не все результаты соответствовали заранее указанным спецификациям. Действительно, снижение концентрации полисорбата 80 наблюдали через 3 месяца при +5±3°C и через 1 месяц при +25±2°C и при +40±2°C. По-видимому, существует тенденция к увеличению значения поглощения при всех температурных условиях хранения, что может быть связано с разрушением в образце. Значение pH и внешний вид жидкости соответствовали заранее указанным спецификациям.

С8 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,4 и ≤6,6)	6,5	6,5	6,5

Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	29,8	23,3	31,6
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,048	0,065	0,231
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	911	932	921
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,02
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 45 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 20 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 107 ≥25 мкм: 10
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +25±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,4 и ≤6,6)	6,5	6,5	6,5
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, слегка желтоватая
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	29,8	17,4	30,9
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,048	0,240	0,231
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	911	935	883
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,03	0,03
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 45 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 55 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 63 ≥25 мкм: 7
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +40±2°C		
		T0	T1M	T3M

И				
рН	рН при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,4$ и $\leq 6,6$)	6,5	6,5	6,4
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, слегка желтоватая
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	29,8	22,9	30,7
A_{280}	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,048	0,238	0,235
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	911	936	925
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,02	0,03
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 45 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 45 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 37 ≥ 25 мкм: 7

Таблица 16: Исследование стабильности С8: 3 месяца хранения при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$, при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$

- Было обнаружено, что разбавитель С8 нестабилен при хранении при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ до 3 месяцев, а также при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ и $+40 \pm 2^\circ\text{C}$ до 1 месяца, поскольку не все результаты соответствовали заранее указанным спецификациям. Действительно, снижение концентрации полисорбата 80 наблюдали через 3 месяца при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ и через 1 месяц при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$. По-видимому, существует тенденция к увеличению значения поглощения при всех температурных условиях хранения, что может быть связано с разрушением в образце.
- Значение рН и внешний вид жидкости соответствовали заранее указанным спецификациям.

С9 – 3 месяца хранения при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$, при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
рН	рН при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,1	6,1	6,1
Внешний	Жидкость от бесцветной до слегка	Прозрачная,	Прозрачна	Прозрачная,

вид	желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	бесцветная	я, бесцветная	бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	31,5	15,0	31,5
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,042	0,037
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	841	855	846
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 5 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 157 ≥25 мкм: 0
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +25±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,1	6,1	6,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	31,5	18,9	31,0
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,042	0,035
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	841	856	854
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 25 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 40 ≥25 мкм: 0
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +40±2°C		
		T0	T1M	T3M

pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,1	6,1	6,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	31,5	19,5	30,2
A_{280}	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,047	0,036
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	841	857	846
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 5 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 110 ≥ 25 мкм: 7

Таблица 17: Исследование стабильности С9: 3 месяца хранения при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$, при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$

Было обнаружено, что разбавитель С9 стабилен при хранении при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$, при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$ до 3 месяцев, поскольку значение pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения проводимости, осмоляльности, значения поглощения (A_{280}) и содержания полисорбата 80.

10 С11 – 3 месяца хранения при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$, при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ и при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,5$ и $\leq 6,7$)	6,6	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропро	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,9	16,1	31,9

водность				
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,036	0,044	0,035
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	837	861	845
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 25 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 15 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 407 ≥25 мкм: 13
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +25±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,5 и ≤6,7)	6,6	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,9	19,8	31,2
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,036	0,044	0,034
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	837	856	861
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в %)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 25 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 45 ≥25 мкм: 15	≥10 мкм: 77 ≥25 мкм: 0
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +40±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,5 и ≤6,7)	6,6	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная

	опалесцирующей	бесцветная		
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,9	15,3	31,0
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,036	0,051	0,036
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	837	860	839
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 25 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 173 ≥25 мкм: 17

Таблица 18: Исследование стабильности C11: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель C11 стабилен при хранении при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значение pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения проводимости, осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80.

10 C12 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,5 и ≤6,7)	6,6	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	26,3	11,5	33,7
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,044	0,035

Осмоляльн ость	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	942	953	933
Полисорба т 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимы е частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 20 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 187 ≥ 25 мкм: 7
Испытани я стабильно сти	Спецификация	Время инкубации при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,5$ и $\leq 6,7$)	6,6	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропр оводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	26,3	18,1	32,6
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,050	0,039
Осмоляльн ость	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	942	953	929
Полисорба т 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,05	0,04
Невидимы е частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 15 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 110 ≥ 25 мкм: 3
Испытани я стабильно сти	Спецификация	Время инкубации при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,5$ и $\leq 6,7$)	6,6	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная

	опалесцирующей			
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	26,3	24,2	32,1
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,051	0,125
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	942	957	938
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 0 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 97 ≥25 мкм: 0

Таблица 19: Исследование стабильности C12: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель C12 стабилен при хранении при +5±3°C и при +25±2°C до 3 месяцев, поскольку значение pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения проводимости, осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80.

Было обнаружено, что разбавитель C12 нестабилен при хранении при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значение поглощения значительно увеличилось по сравнению со значением T0 (от 0,037 ед. погл. до 0,125 ед. погл.). Значение pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствуют заранее указанным спецификациям.

C14 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,9 и ≤7,1)	7,0	7,0	7,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропровод	Отчет о результатах (в мСм/см)	27,7	20,5	33,9

ность				
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,047	0,036
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	959	959	949
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 55 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 5 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 180 ≥25 мкм: 0
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +25±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,9 и ≤7,1)	7,0	7,0	7,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	27,7	17,6	32,6
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,046	0,045
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	959	961	946
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 55 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 40 ≥25 мкм: 20	≥10 мкм: 390 ≥25 мкм: 43
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +40±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,9 и ≤7,1)	7,0	7,0	7,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	27,7	24,6	32,4

ность				
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,053	0,223
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	959	961	947
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 55 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 15 ≥25 мкм: 5	≥10 мкм: 193 ≥25 мкм: 13

Таблица 20: Исследование стабильности С14: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель С14 стабилен при хранении при +5±3°C и при +25±2°C до 3 месяцев, поскольку значение рН, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80. Было обнаружено, что разбавитель С14 нестабилен при хранении при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значение поглощения значительно увеличилось по сравнению со значением Т0 (от 0,037 ед. погл. до 0,223 ед. погл.). Результаты всех остальных испытаний (рН, внешний вид жидкости, содержание невидимых частиц) соответствуют заранее указанным спецификациям. Осмоляльность, значение поглощения (A₂₈₀) и содержание полисорбата 80 не изменялись в значительной степени.

С16 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		Т0	Т1М	Т3М
рН	рН при Т0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,1	6,1	6,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	32,6	24,6	34,4

A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,047	0,035
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	951	968	958
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 65 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 20 ≥25 мкм: 5	≥10 мкм: 110 ≥25 мкм: 7
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +25±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,1	6,1	6,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	32,6	21,0	33,0
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,044	0,037
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	951	967	949
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 65 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 25 ≥25 мкм: 5	≥10 мкм: 90 ≥25 мкм: 3
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +40±2°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,1	6,2	6,2
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная

Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	32,6	22,9	32,5
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,048	0,042
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	951	966	933
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 65 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 5	≥10 мкм: 290 ≥25 мкм: 0

Таблица 21: Исследование стабильности C16: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель C16 стабилен при хранении при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значение pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения проводимости, осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80.

10 C17 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥7,0 и ≤7,2)	7,1	7,1	7,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	26,8	20,9	32,2
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,035	0,044	0,034
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	865	868	847

сть				
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 385 ≥ 25 мкм: 35	≥ 10 мкм: 40 ≥ 25 мкм: 5	≥ 10 мкм: 160 ≥ 25 мкм: 10
Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 7,0$ и $\leq 7,2$)	7,1	7,1	7,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачна я, бесцветна я	Прозрачная, бесцветная
Электропро водность	Отчет о результатах (в мСм/см)	26,8	17,1	30,6
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,035	0,056	0,035
Осмоляльно сть	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	865	867	858
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 385 ≥ 25 мкм: 35	≥ 10 мкм: 15 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 23 ≥ 25 мкм: 0
Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 7,0$ и $\leq 7,2$)	7,1	7,1	7,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачна я, бесцветна я	Прозрачная, бесцветная

Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	26,8	21,9	30,9
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,035	0,043	0,039
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	865	869	858
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 385 ≥25 мкм: 35	≥10 мкм: 20 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 143 ≥25 мкм: 7

Таблица 22: Исследование стабильности C17: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель C17 стабилен при хранении при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значение pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80.

10 C18 – 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥7,0 и ≤7,2)	7,1	7,1	7,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	22,9	29,9	33,1
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,041	0,053	0,035
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	944	966	945

сть				
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 40 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 75 ≥ 25 мкм: 5	≥ 10 мкм: 80 ≥ 25 мкм: 0
Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при $+25 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 7,0$ и $\leq 7,2$)	7,1	7,1	7,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрач ая, бесцветн ая	Прозрачная , бесцветная
Электропро водность	Отчет о результатах (в мСм/см)	22,9	21,6	32,9
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,041	0,045	0,039
Осмоляльно сть	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	944	964	953
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 40 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 20 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 90 ≥ 25 мкм: 3
Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при $+40 \pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 7,0$ и $\leq 7,2$)	7,1	7,1	7,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка	Прозрачная, бесцветная	Прозрачн ая,	Прозрачная, бесцветная

	опалесцирующей		бесцветная	
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	22,9	16,8	31,7
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,041	0,048	0,047
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	944	965	946
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 40 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 25 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 117 ≥25 мкм: 3

Таблица 23: Исследование стабильности C18: 3 месяца хранения при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C

Было обнаружено, что разбавитель C18 стабилен при хранении при +5±3°C, при +25±2°C и при +40±2°C до 3 месяцев, поскольку значение pH, внешний вид жидкости и содержание невидимых частиц соответствовали заранее указанным спецификациям. Не наблюдали значительного изменения осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80. По-видимому, имеет место тенденция к увеличению электропроводности, не связанная с температурой, поскольку это происходит при всех температурных условиях хранения. Следовательно, это не связано с нестабильностью образца.

На основании приведенных выше результатов можно сделать следующие выводы:

1. Разбавители на основе фосфатов (C9, C11) с аргинином-HCl и полисорбатом 80 были стабильны до 3 месяцев при всех температурах. Разбавители на основе цитрата (C3 и C4) с аргинином-HCl и полисорбатом 80 были стабильны после 3 месяцев при всех температурах хранения. Разбавители на основе гистидина (C7 и C8) с любым из лизина-HCl/аргинина-HCl и полисорбатом 80 были нестабильны после 1 месяца хранения при повышенных температурах, которые равны или превышают +25°C, и нестабильны после 3 месяцев хранения при +5±3°C.

2. Разбавители, содержащие лизин-НСI (C8, C12 и C14), были более нестабильны в ускоренном исследовании хранения и стрессовых температурных условиях, чем разбавители с аргинином-НСI (C9 и C11).

3. Использование двойной буферной системы (цитрат-фосфат) значительно улучшило стабильность разбавителей, содержащих лизин-НСI (C14 по сравнению с C18), в стрессовых условиях хранения, поскольку C18 был стабилен при любой температуре хранения после 3 месяцев, а C14 был нестабилен через 3 месяца только в стрессовых условиях.

4. Разбавитель, содержащий лизин-НСI при pH 6,5 (C14), оказался нестабильным после 3 месяцев хранения в стрессовых условиях, в то время как разбавитель, содержащий аргинин-НСI при pH 6,5 (C12), оказался стабильным после 3 месяцев хранения в стрессовых условиях. Таким образом, при pH 6,5 предпочтительной является буферная система, сочетающая фосфат и аргинин-НСI.

Соответственно, было обнаружено, что лучшей композиционной комбинацией является буфер с фосфатом и аргинином-НСI с полисорбатом 80 (C9, C11). Однако, учитывая потенциал двойных буферных систем (C16) в стабилизации системы на основе лизина-НСI, мониторинг их стабильности также представляется интересным. Следовательно, окончательными тремя разбавителями, отобранными для исследования долгосрочной стабильности, являются C9, C11 и C16.

C9 – 29 месяцев хранения при $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$			
		T0	T1M	T3M	T6M
pH	pH при $T0\pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,1	6,1	6,1	6,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	31,5	15,0	31,5	29,9
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед.)	0,037	0,042	0,037	0,037

	погл.)				
Осмоляльно сть	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	841	855	846	855
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 10 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 160 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 140 ≥25 мкм: 20
Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C			
		T9M	T12M	T18M	T29M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,0	6,0	6,0	6,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачна я, бесцветна я	Прозрачная, бесцветная	Прозрачна я, бесцветна я
Электропро водность	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,1	30,4	30,1	28,0
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,033	0,034	0,032	0,031
Осмоляльно сть	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	850	851	850	866
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,05	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 153 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 20 ≥25 мкм: 7	≥10 мкм: 200 ≥25 мкм: 33	≥10 мкм: 3 ≥25 мкм: 0

Таблица 24: Исследование стабильности С9: 29 месяцев хранения при +5±3°C

С9 – 12 месяцев хранения при $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$					
		T0	T1M	T3M	T6M	T9M	T12M
pH	pH при $T0\pm 0,1$ (т.е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	31,5	18,9	31,0	30,0	30,3	30,8
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,042	0,035	0,037	0,030	0,032
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	841	856	854	849	859	847
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 40 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 80 ≥ 25 мкм: 10	≥ 10 мкм: 147 ≥ 25 мкм: 1	≥ 10 мкм: 57 ≥ 25 мкм: 0

	мкм						
--	-----	--	--	--	--	--	--

Таблица 25: Исследование стабильности С9: 12 месяцев хранения при $+25\pm 2^\circ\text{C}$ С9 – 3 месяца хранения при $+40\pm 2^\circ\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+40\pm 2^\circ\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0\pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,1	6,1	6,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	31,5	19,5	30,2
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,047	0,036
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	841	857	846
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 10 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 110 ≥ 25 мкм: 10

Таблица 26: Исследование стабильности С9: 3 месяца хранения при $+40\pm 2^\circ\text{C}$

5

С11 - 29 месяцев хранения при $+5\pm 3^\circ\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+5\pm 3^\circ\text{C}$			
		T0	T1M	T3M	T6M
pH	pH при $T0\pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,6	6,6	6,6	6,5
Внешний	Жидкость от бесцветной до	Прозрачная,	Прозрачная	Прозрачная,	Прозрачная

вид	слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	бесцветная	я, бесцветная	бесцветная	я, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,9	16,1	31,9	30,3
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,036	0,044	0,035	0,037
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	837	861	845	853
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 30 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 20 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 410 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 110 ≥25 мкм: 10
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C			
		T9M	T12M	T18M	T29M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,5	6,5	6,5	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,3	31,0	31,1	27,8
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,032	0,034	0,030	0,032
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	865	877	857	861
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04	0,04
Невидимые	≤6000 частиц на контейнер	≥10 мкм:	≥10 мкм:	≥10 мкм:	≥10 мкм: 6

частицы (SVP)	размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	143 ≥ 25 мкм: 7	73 ≥ 25 мкм: 57	333 ≥ 25 мкм: 50	≥ 25 мкм: 0
------------------	--	-------------------------	-------------------------	--------------------------	------------------

Таблица 27: Исследование стабильности C11: 29 месяцев хранения при $+5\pm 3^\circ\text{C}$ C11- 12 месяцев хранения при $+25\pm 2^\circ\text{C}$

Испытания стабильнос ти	Спецификация	Время инкубации при $+25\pm 2^\circ\text{C}$					
		T0	T1M	T3M	T6M	T9M	T12M
pH	pH при $T_0 \pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,5$ и $\leq 6,7$)	6,6	6,6	6,6	6,5	6,5	6,5
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачн ая, бесцветн ая	Прозрачн ая, бесцветн ая	Прозрачн ая, бесцветн ая	Прозрач ная, бесцвет ная	Прозрачн ая, бесцветн ая	Прозрач ная, бесцветн ая
Электропро водность	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,9	19,8	31,2	30,3	30,5	30,8
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,036	0,044	0,034	0,033	0,031	0,033
Осмоляльно сть	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	837	856	861	858	861	850
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 50 ≥ 25 мкм: 20	≥ 10 мкм: 80 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 170 ≥ 25 мкм: 40	≥ 10 мкм: 183 ≥ 25 мкм: 3	≥ 10 мкм: 43 ≥ 25 мкм: 0

Таблица 28: Исследование стабильности C11: 12 месяцев хранения при $+25\pm 2^\circ\text{C}$

C11 – 3 месяца хранения при $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$		
		T0	T1M	T3M
pH	pH при $T0\pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,5$ и $\leq 6,7$)	6,6	6,6	6,6
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	30,9	15,3	31,0
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,036	0,051	0,036
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	837	860	839
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 3 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 3 ≥ 25 мкм: 1	≥ 10 мкм: 17 ≥ 25 мкм: 2

Таблица 29: Исследование стабильности C11: 3 месяца хранения при $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 5 C16 – 29 месяцев хранения при $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$			
		T0	T1M	T3M	T6M
pH	pH при $T0\pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,1	6,1	6,1	6,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропро	Отчет о результатах (в мСм/см)	32,6	24,6	34,4	32,3

водность					
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,047	0,035	0,040
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	951	968	958	983
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 70 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 20 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 110 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 290 ≥25 мкм: 30
Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при +5±3°C			
		T9M	T12M	T18M	T29M
pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,0	6,0	6,1	6,1
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	33,1	33,4	33,2	11,2 (2)
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,036	0,030	0,032
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	971	984	963	965
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,05	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 160 ≥25 мкм: 7	≥10 мкм: 27 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 167 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 2 ≥25 мкм: 0

Таблица 30: Исследование стабильности C16: 29 месяцев хранения при +5±3°C

C16 – 12 месяцев хранения при $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$					
		T0	T1M	T3M	T6M	T9M	T12M
pH	pH при $T_0\pm 0,1$ (т. е. $\geq 6,0$ и $\leq 6,2$)	6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,0
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачная, бесцветная
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	32,6	21,0	33,0	32,9	32,5	32,6
A_{280}	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,044	0,037	0,042	0,039	0,038
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	951	967	949	977	978	973
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤ 6000 частиц на контейнер размером ≥ 10 мкм и ≤ 600 частиц на контейнер размером ≥ 25 мкм	≥ 10 мкм: 70 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 30 ≥ 25 мкм: 10	≥ 10 мкм: 90 ≥ 25 мкм: 0	≥ 10 мкм: 320 ≥ 25 мкм: 20	≥ 10 мкм: 183 ≥ 25 мкм: 3	≥ 10 мкм: 40 ≥ 25 мкм: 3

Таблица 31: Исследование стабильности C16: 12 месяцев хранения при $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

5 C16 – 3 месяца хранения при $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$

Испытания стабильности	Спецификация	Время инкубации при $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$		
		T0	T1M	T3M

pH	pH при T0±0,1 (т. е. ≥6,0 и ≤6,2)	6,1	6,2	6,2
Внешний вид	Жидкость от бесцветной до слегка желтоватой, от прозрачной до слегка опалесцирующей	Прозрачна я, бесцветная	Прозрачная, бесцветная	Прозрачна я, бесцветна я
Электропроводность	Отчет о результатах (в мСм/см)	32,6	22,9	32,5
A ₂₈₀	Отчет о результатах (в ед. погл.)	0,037	0,048	0,042
Осмоляльность	Отчет о результатах (в мОсм/кг)	951	966	933
Полисорбат 80	Отчет о результатах (в % масс./об.)	0,04	0,04	0,04
Невидимые частицы (SVP)	≤6000 частиц на контейнер размером ≥10 мкм и ≤600 частиц на контейнер размером ≥25 мкм	≥10 мкм: 70 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм:30 ≥25 мкм: 10	≥10 мкм: 290 ≥25 мкм: 0

Таблица 32: Исследование стабильности C16: 3 месяца хранения при +40±2°C

В заключение, на основании имеющихся данных:

- 5 - разбавитель C9 стабилен до 29 месяцев при хранении при +5±3°C, до 12 месяцев при хранении при +25±2°C и до 3 месяцев при хранении при +40±2°C во флаконах объемом 10 мл (VCDIN10R, от Schott), поскольку это соответствует заранее указанным спецификациям в отношении pH, внешнего вида жидкости и содержания невидимых частиц. Не наблюдали значительного изменения проводимости, осмоляльности, значения поглощения (A₂₈₀) и содержания полисорбата 80.
- 10 - Разбавитель C11 стабилен до 29 месяцев при хранении при +5±3°C, до 12 месяцев при хранении при +25±2°C и до 3 месяцев при хранении при +40±2°C во флаконах объемом 10 мл (VCDIN10R, от Schott), поскольку это соответствует заранее указанным спецификациям в отношении pH, внешнего вида жидкости и содержания невидимых частиц. Не наблюдали значительного изменения проводимости,
- 15 - Разбавитель C16 стабилен до 29 месяцев при хранении при +5±3°C, до 12 месяцев при хранении при +25±2°C и до 3 месяцев при хранении при +40±2°C во

флаконах объемом 10 мл (VCDIN10R, от Schott), поскольку это соответствует заранее указанным спецификациям в отношении pH, внешнего вида жидкости и содержания невидимых частиц. Не наблюдали значительного изменения проводимости, осмоляльности, значения поглощения (A_{280}) и содержания полисорбата 80.

5

Разбавитель	Композиция состава	Температурное условие		
		+5±3°C	+25±2°C	+40±2°C
C3	25 мМ цитрата, 500 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 6,5	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М
C4	25 мМ цитрата, 500 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 7,0	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М
C7	25 мМ гистидина, 500 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 6,5	Нестабил ен до 3 М	Нестабил ен до 1 М	Нестабил ен до 1 М
C8	25 мМ гистидина, 500 мМ моногидрохлорида L-лизина, 0,04% полисорбата 80, pH 6,5	Нестабил ен до 3 М	Нестабил ен до 1 М	Нестабил ен до 1 М
C9	25 мМ фосфата, 500 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 6,0	Стабилен до 29 М	Стабилен до 12 М	Стабилен до 3 М
C11	25 мМ фосфата, 500 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 6,5	Стабилен до 29 М	Стабилен до 12 М	Стабилен до 3 М
C12	25 мМ фосфата, 500 мМ моногидрохлорида L-лизина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 6,5	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М	Нестабил ен до 3 М
C14	25 мМ фосфата, 500 мМ моногидрохлорида L-лизина, 0,04% полисорбата 80, pH 7,0	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М	Нестабил ен до 3 М
C16	25 мМ цитрата-фосфата, 500 мМ	Стабилен	Стабилен	Стабилен

	моногидрохлорида L-лизина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 6,0	до 29 М	до 12 М	до 3 М
C17	25 мМ цитрата-фосфата, 500 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 7,0	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М
C18	25 мМ цитрата-фосфата, 500 мМ моногидрохлорида L-лизина, 0,04% масс./об. полисорбата 80, pH 7,0	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М	Стабилен до 3 М

Таблица 33: Краткий обзор результатов

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Разбавитель для разбавления лекарственного продукта, при этом указанный разбавитель содержит буфер и один или более стабилизирующих или регулирующих
5 тоничность агентов, причем указанный лекарственный продукт содержит мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела, содержащий первый и второй сконструированный домен СНЗ, и при этом при разбавлении указанного лекарственного продукта указанным разбавителем получают лекарственный продукт, готовый для введения пациенту путем инфузии, характеризующийся
10 тем, что указанный разбавитель такой, что потеря материала антитела в системе для инфузии, измеренная с помощью ИФА, составляет менее, чем приблизительно 30%.

2. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный разбавитель имеет рН от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,5.

15 3. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный буфер выбран из группы, включающей гистидин, трис, цитрат, фосфат и цитрат-фосфат, причем указанный буфер присутствует в указанном разбавителе в концентрации, равной или меньшей 30 мМ.

20 4. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный стабилизирующий или регулирующий тоничность агент выбран из группы, включающей полиолы, такие как полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 80, аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, глицин, метионин, пролин, лизин, соли, такие как хлорид натрия.

25 5. Разбавитель по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный буфер выбран из группы, включающей гистидин, трис и фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и указанные стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты содержат аргинин, присутствующий в указанном разбавителе в
30 концентрации приблизительно 100 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,05% (масс./об.) или в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), и при этом указанный разбавитель имеет рН приблизительно 7 или приблизительно 7,4.

6. Разбавитель по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный буфер представляет собой цитрат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 1,1 мМ, и указанные стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты содержат лизин-НСI, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 62 мМ, хлорид натрия, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 154 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,004% (масс./об.), и при этом указанный разбавитель имеет рН от приблизительно 6,6 до приблизительно 7.

7. Разбавитель по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный разбавитель содержит буфер, выбранный из группы, включающей гистидин, фосфат, цитрат и цитрат-фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и указанные стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты, содержат аргинин-НСI или лизин-НСI, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и при этом указанный разбавитель имеет рН, выбранный из группы, включающей приблизительно 6, приблизительно 6,5 и приблизительно 7.

8. Разбавитель по п. 7, отличающийся тем, что указанный буфер выбран из группы, включающей фосфат, цитрат и цитрат-фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и указанные стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты содержат аргинин-НСI или лизин-НСI, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и при этом указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6,5 или приблизительно 7 и стабилен при приблизительно 5°C и/или приблизительно 25°C и/или при 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

9. Разбавитель по п. 7, отличающийся тем, что указанный буфер представляет собой фосфат или цитрат-фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, и указанные стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты содержат аргинин-НСI или лизин-НСI, присутствующий в указанном разбавителе в

концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и при этом указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6 или приблизительно 6,5 и стабилен при приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 29 месяцев, при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 12 месяцев и при приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

10. Разбавитель по п. 9, отличающийся тем, что указанный буфер представляет собой фосфат, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 25 мМ, указанные стабилизирующие или регулирующие тоничность агенты представляют собой аргинин-HCl, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 500 мМ, и полисорбат 80, присутствующий в указанном разбавителе в концентрации приблизительно 0,04% (масс./об.), и при этом указанный разбавитель имеет рН приблизительно 6 и стабилен при приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 29 месяцев, при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 12 месяцев и при приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

11. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что изотонический раствор, выбранный из группы, включающей физиологический раствор, раствор декстрозы и комбинацию физиологического раствора и раствора декстрозы, смешивают с указанным разбавителем в соотношении приблизительно 1:10.

12. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, где указанное мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела присутствует в указанном готовом для введения лекарственном продукте в концентрации от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 20 нг/мл.

13. Разбавитель по п. 12, где указанное мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела присутствует в указанном готовом для введения лекарственном продукте в концентрации приблизительно 10 нг/мл.

14. Разбавитель по п. 1, где указанный первый сконструированный домен CH3 содержит замены из группы, состоящей из: S20K, T22V, K26T, K79Y, F85L, Y86V, K88W, T90N, и

указанный второй сконструированный домен CH3 содержит замены из группы, состоящей из: Q3E, Y5A, L7F, S20T, T22V, K26T, T81D, V84L, D84.2E, F85.1A, Y86S, K88R, T90R, и причем указанный мультиспецифичный гетеродимерный иммуноглобулин или гетеродимерный фрагмент гетеродимеризуются посредством указанных первого и второго сконструированных доменов CH3.

15. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, где указанное мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с первой мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16, со второй мишенью, отличной от указанной первой мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16, и с третьей мишенью, отличной от указанной первой мишени или отличной от указанной первой и указанной второй мишеней, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16.

16. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, где указанное мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела связывается с первой мишенью, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16, и со второй мишенью, отличной от указанной первой мишени, выбранной из группы, включающей CD3, HER2, CD38, EGFR, CD20, OX40, CD19, CD47, IL1RAP, BMCA, NKp30 и CD16.

17. Разбавитель по любому из предыдущих пунктов, где указанное мультиспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела представляет собой биспецифичное гетеродимерное антитело или фрагмент указанного гетеродимерного антитела, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, или содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9, или аминокислотные последовательности, гомологичные по меньшей мере на 80% аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 1-9.

18. Лекарственный продукт, готовый для введения пациенту, для применения при лечении рака, полученный с помощью этапов, включающих:

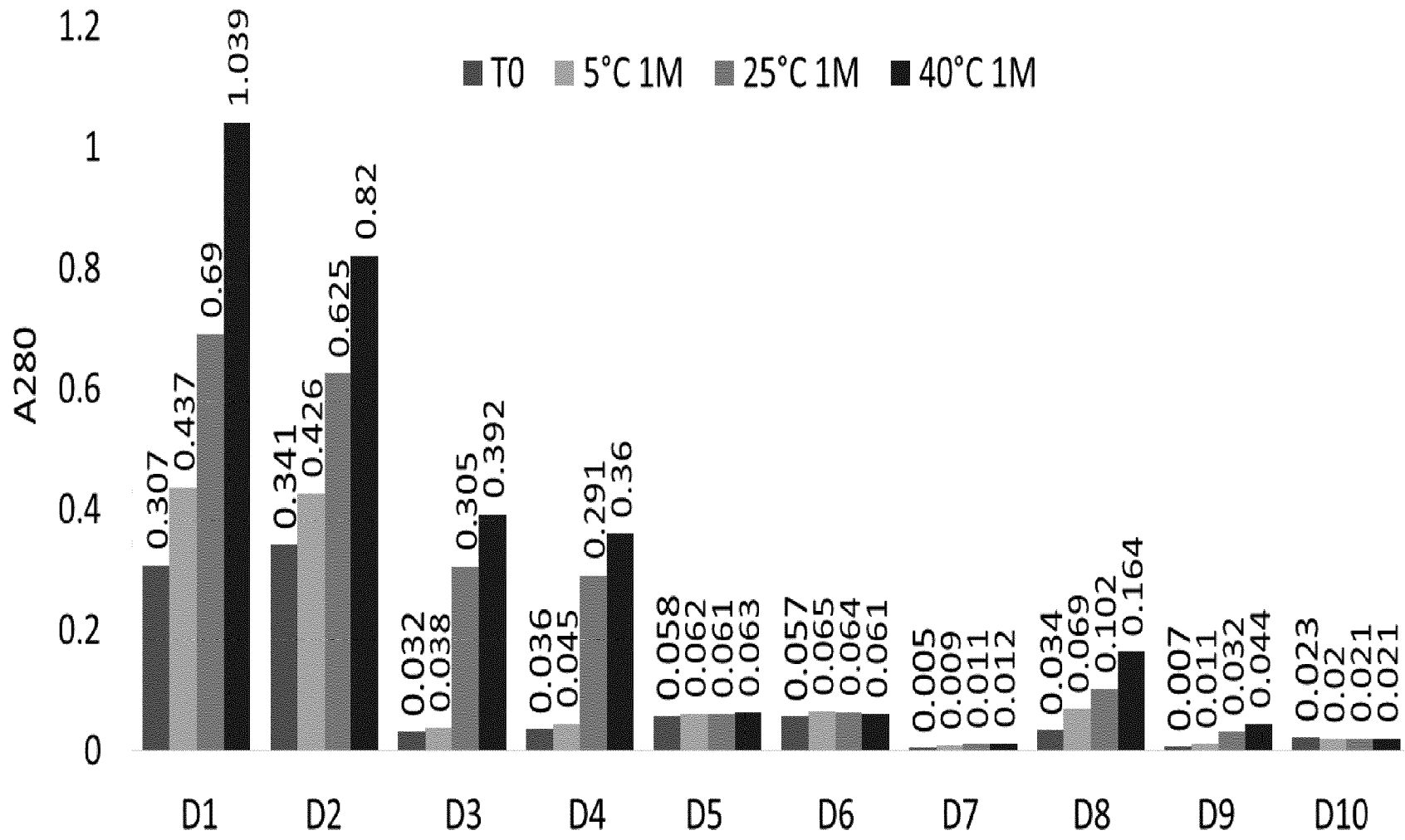
(i) очистку мультиспецифичного гетеродимерного антитела или фрагмента указанного гетеродимерного антитела с получением лекарственного вещества;

5 (ii) добавление вспомогательных веществ к указанному лекарственному веществу с получением стабильного фармацевтического состава, причем указанный стабильный фармацевтический состав может быть жидким или лиофилизированным, или восстановленным;

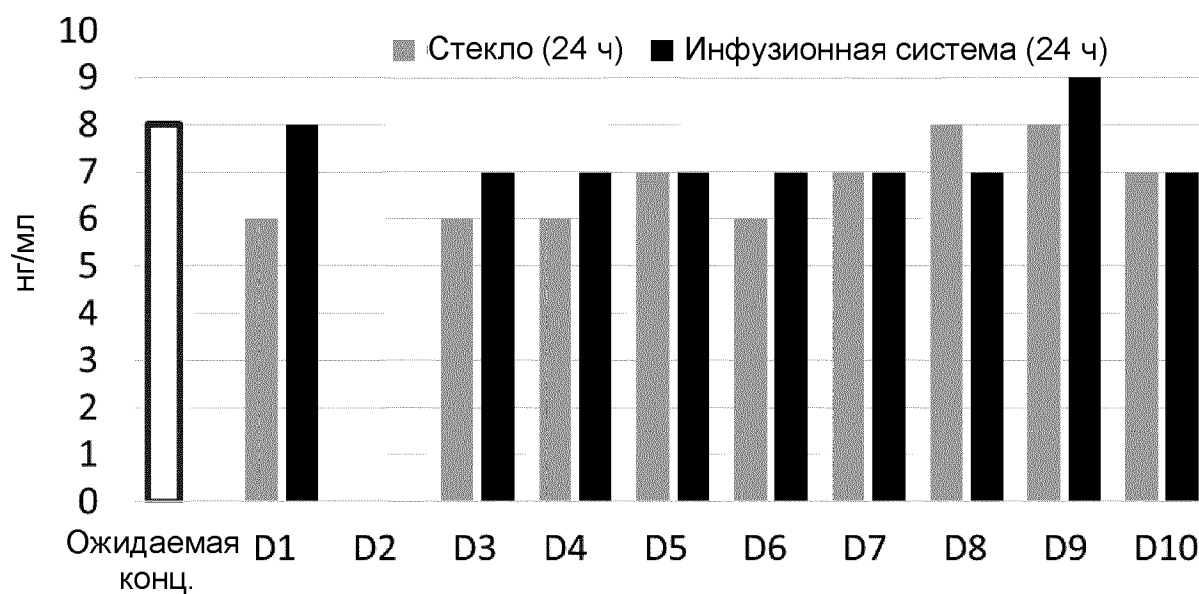
10 (iii) добавление к указанному стабильному фармацевтическому составу разбавителя по любому из пп. 2-11;

причем указанный готовый для введения лекарственный продукт вводят пациенту путем инфузии, и указанный разбавитель такой, что потеря материала антитела в системе для инфузии, измеренная с помощью ИФА, составляет менее, чем приблизительно 30%.

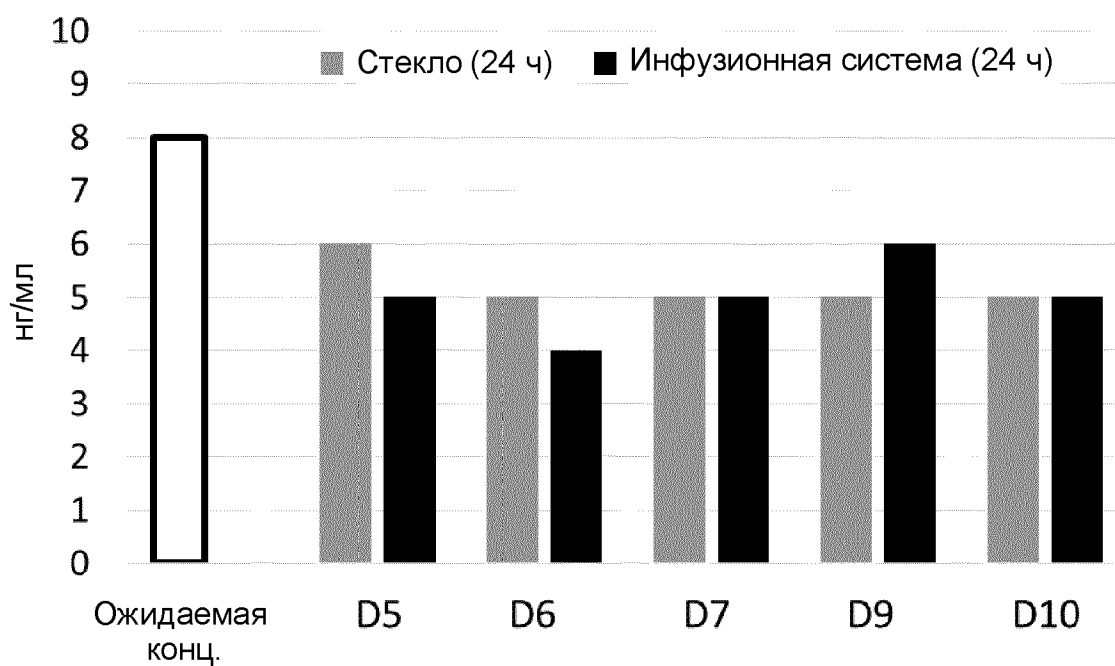
ФИГ. 1



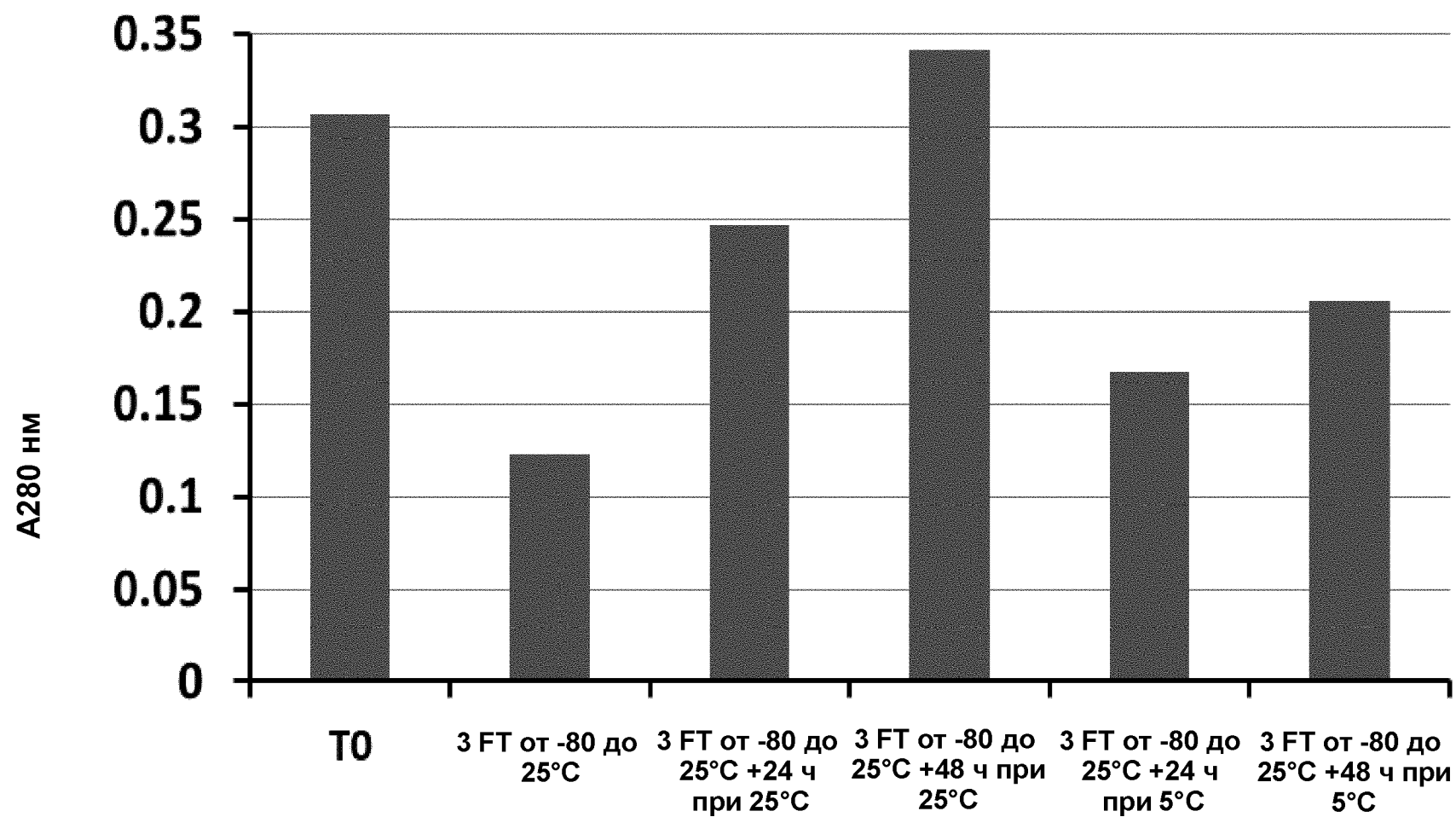
ФИГ. 2



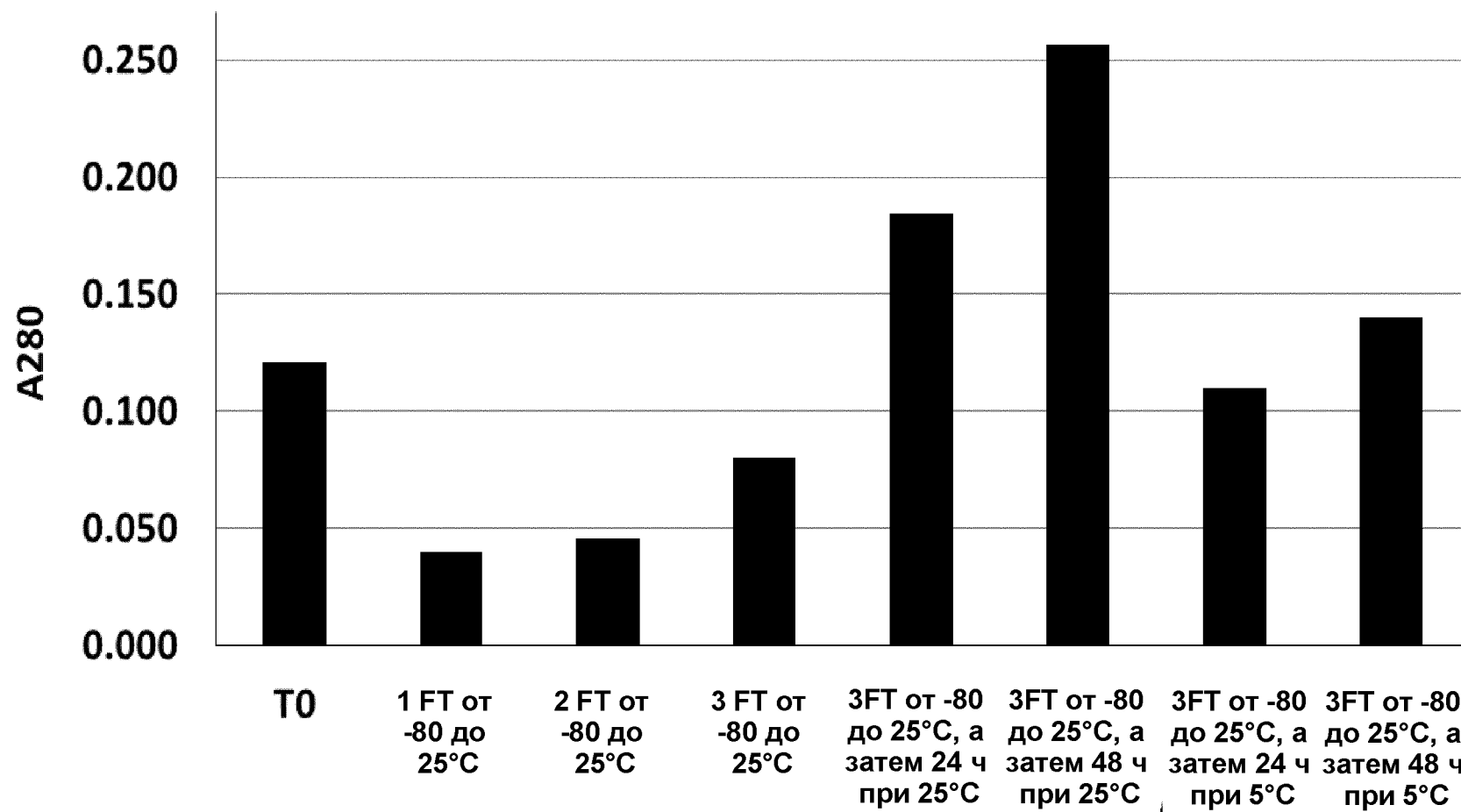
ФИГ. 3



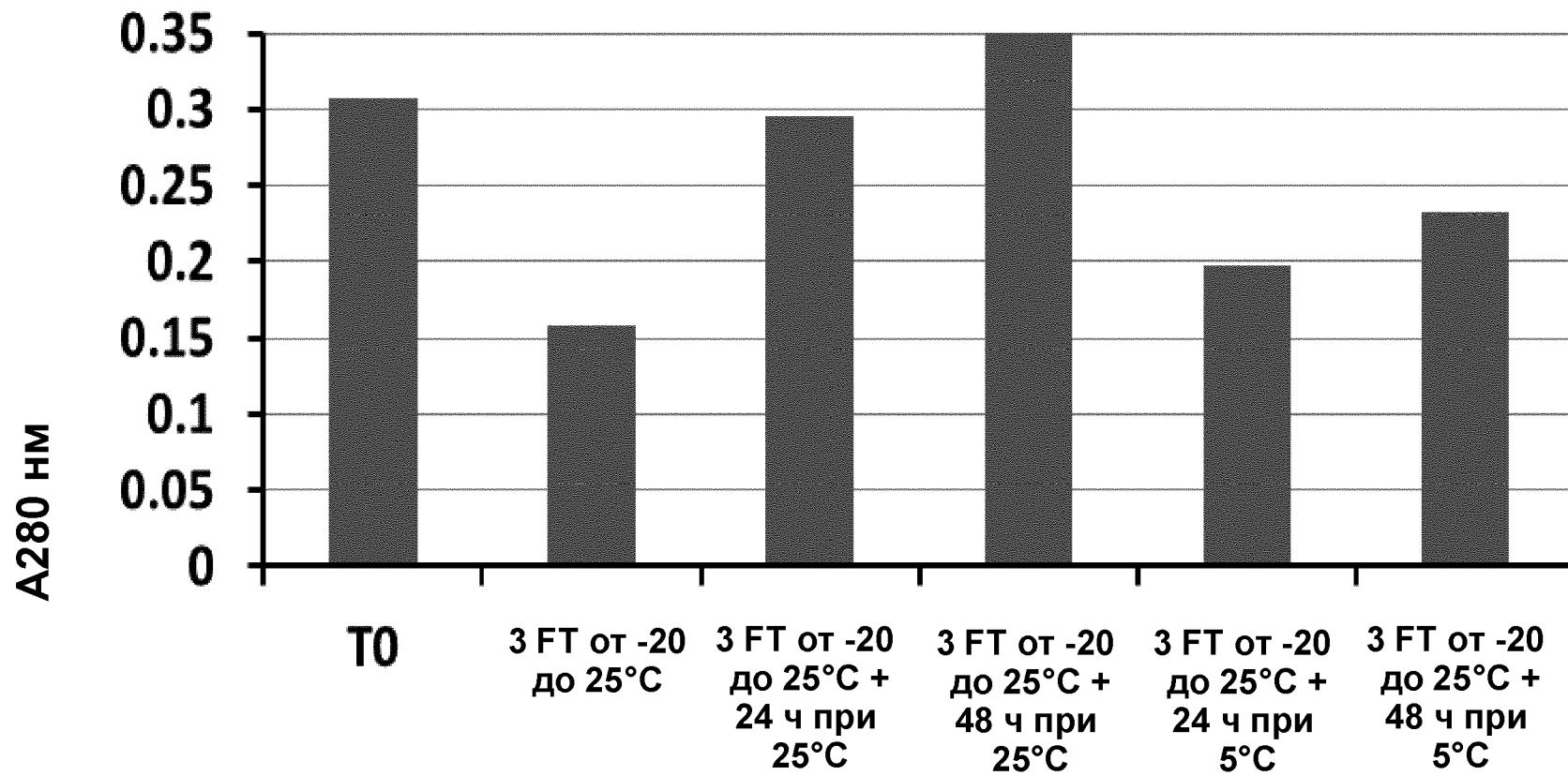
ФИГ. 4



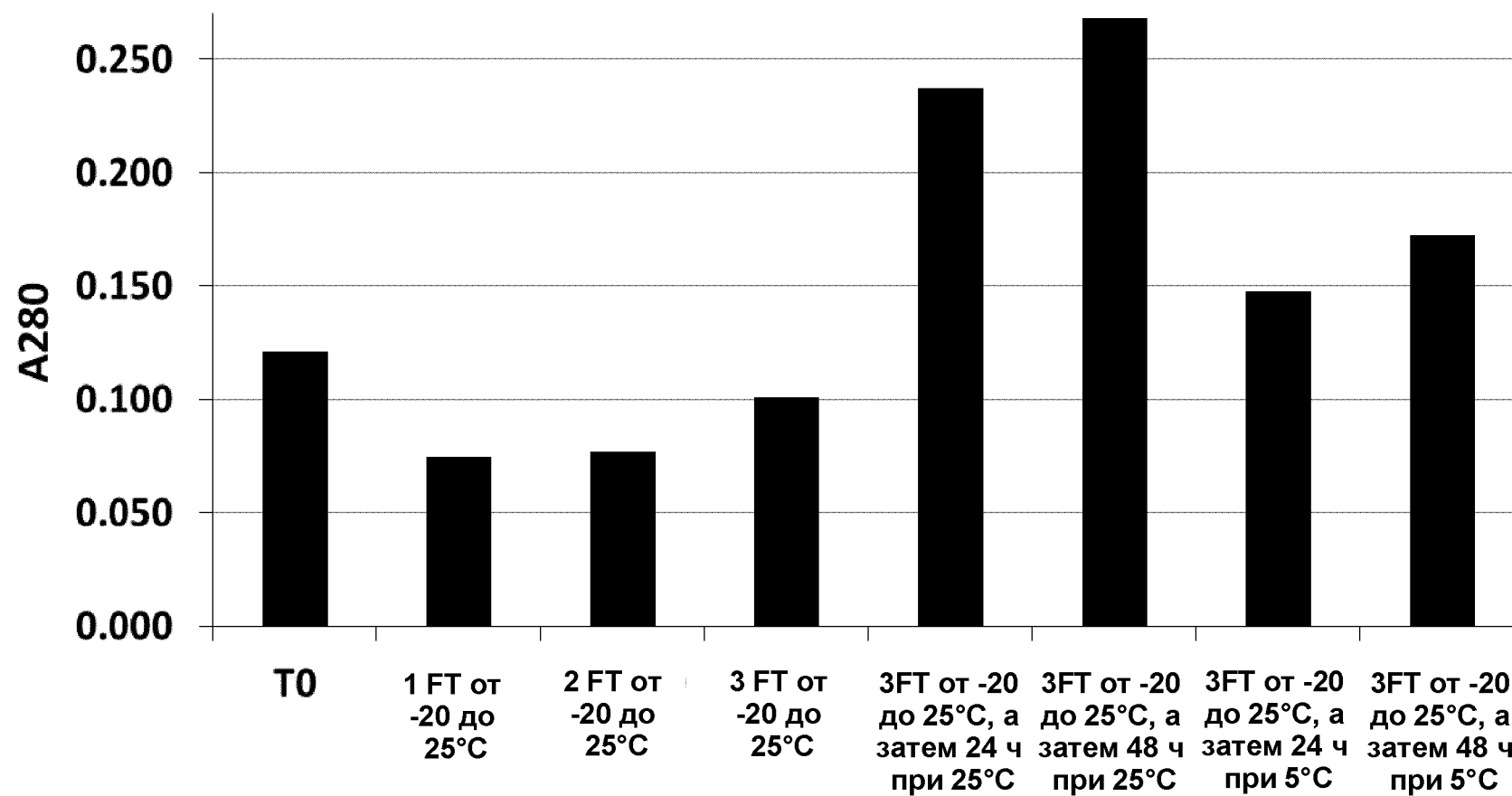
ФИГ. 5



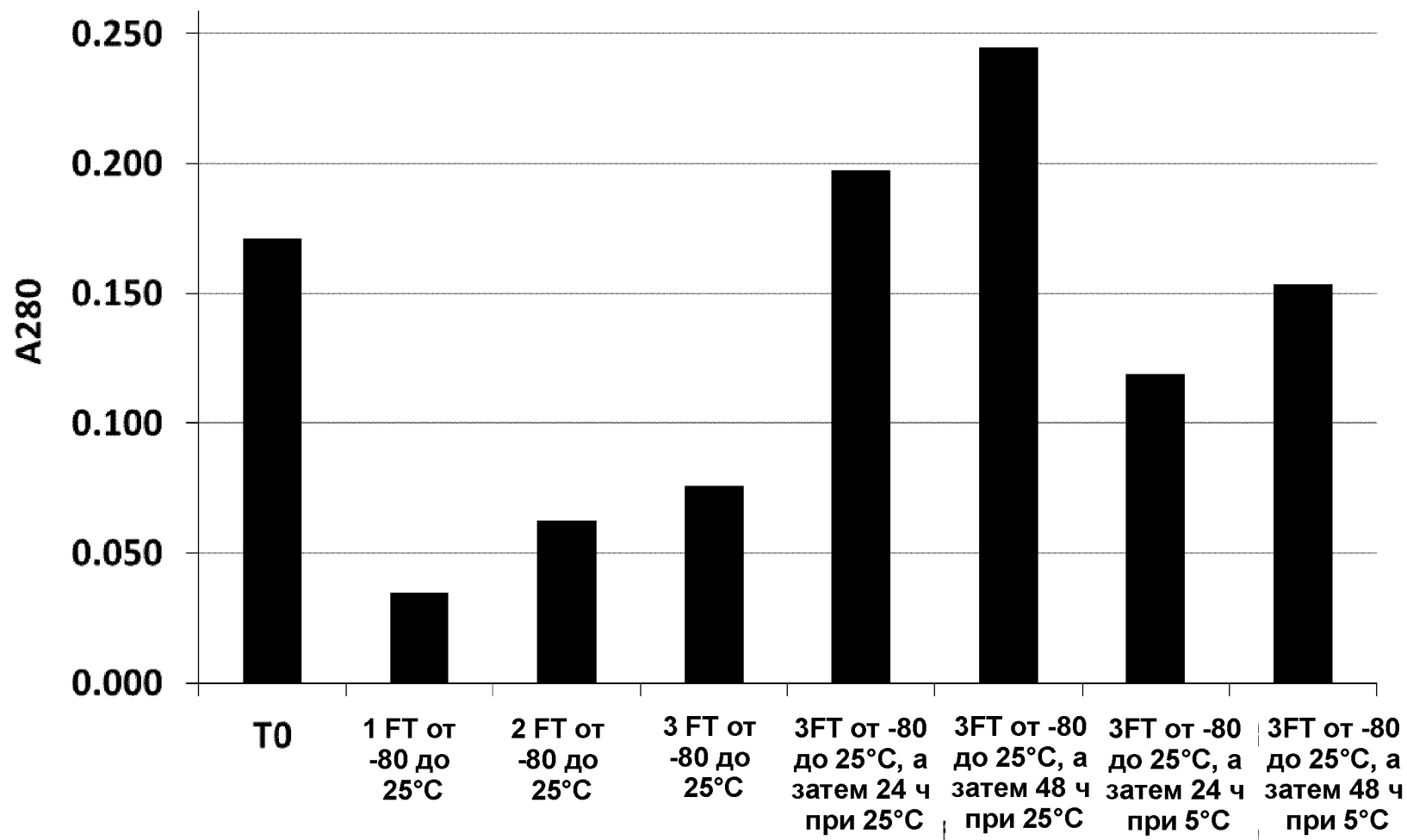
ФИГ. 6



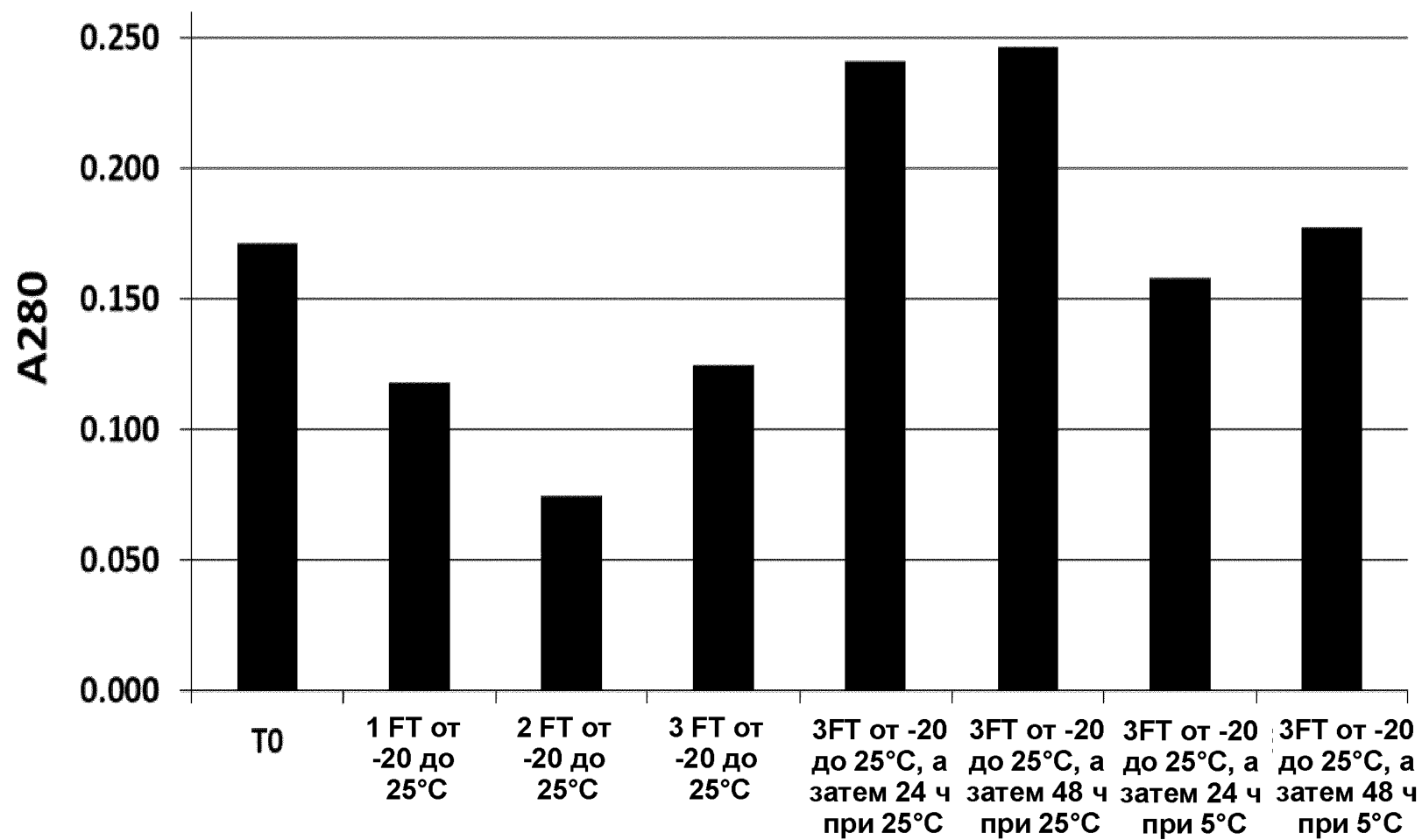
ФИГ. 7



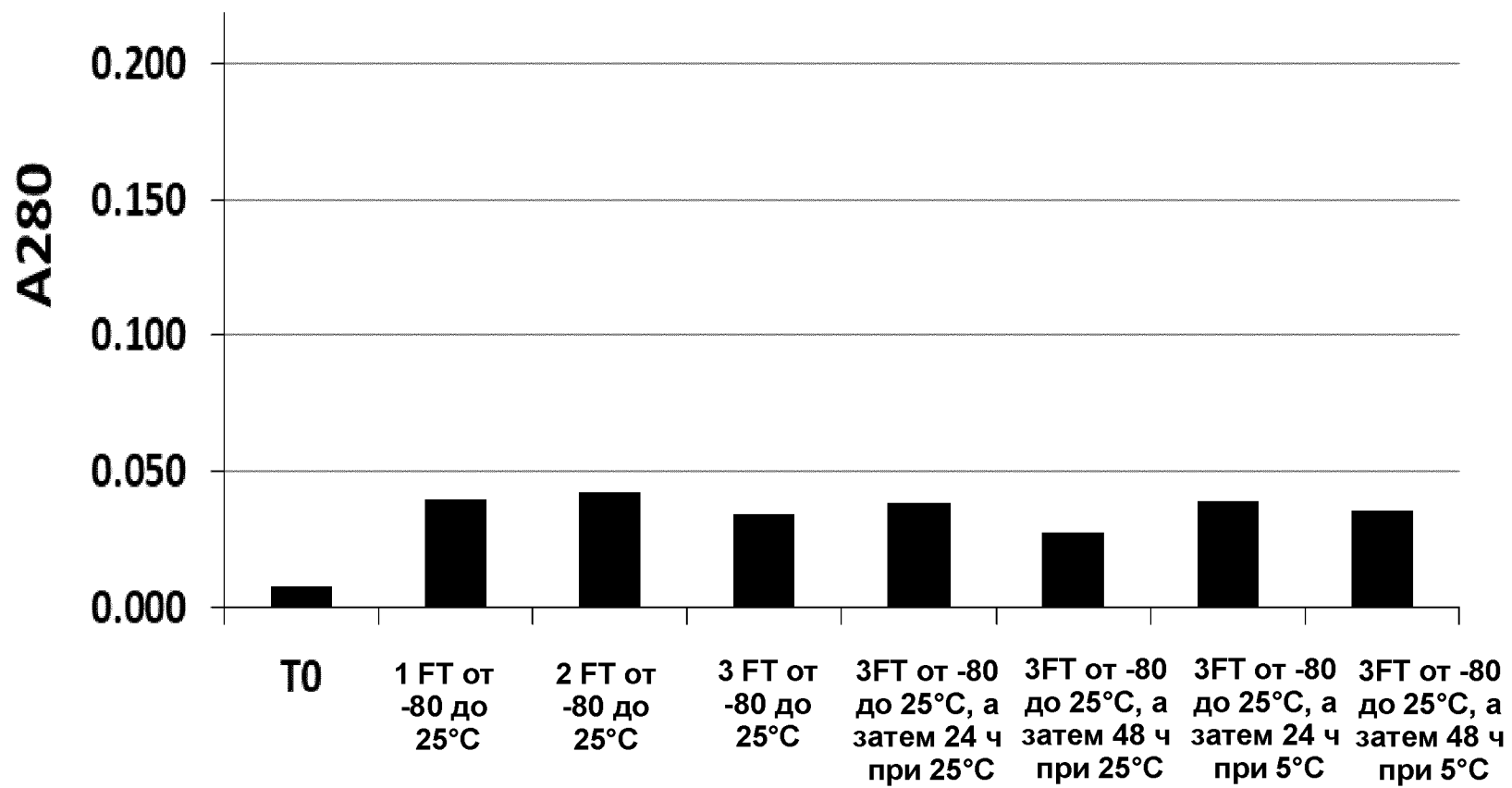
ФИГ. 8



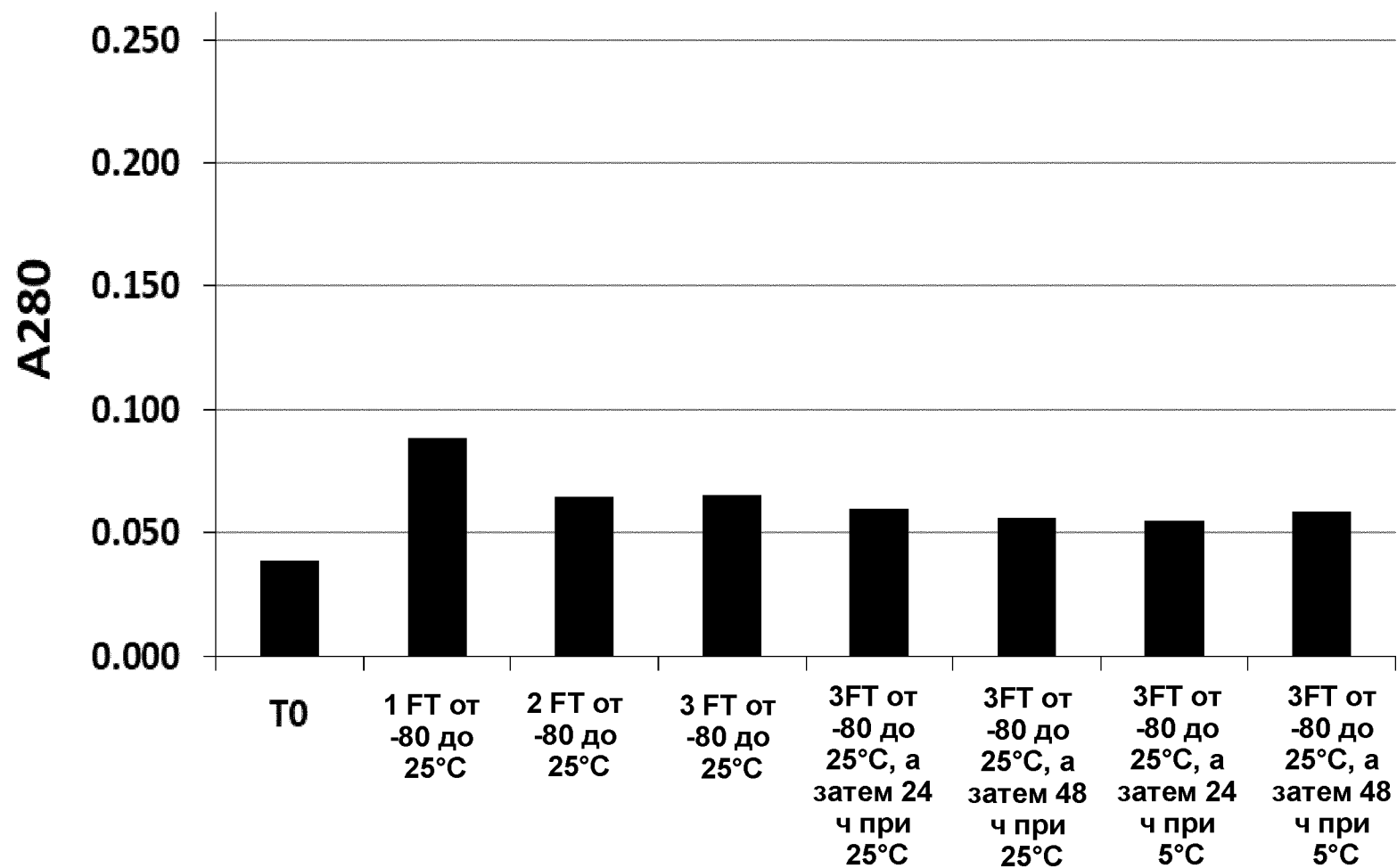
ФИГ. 9



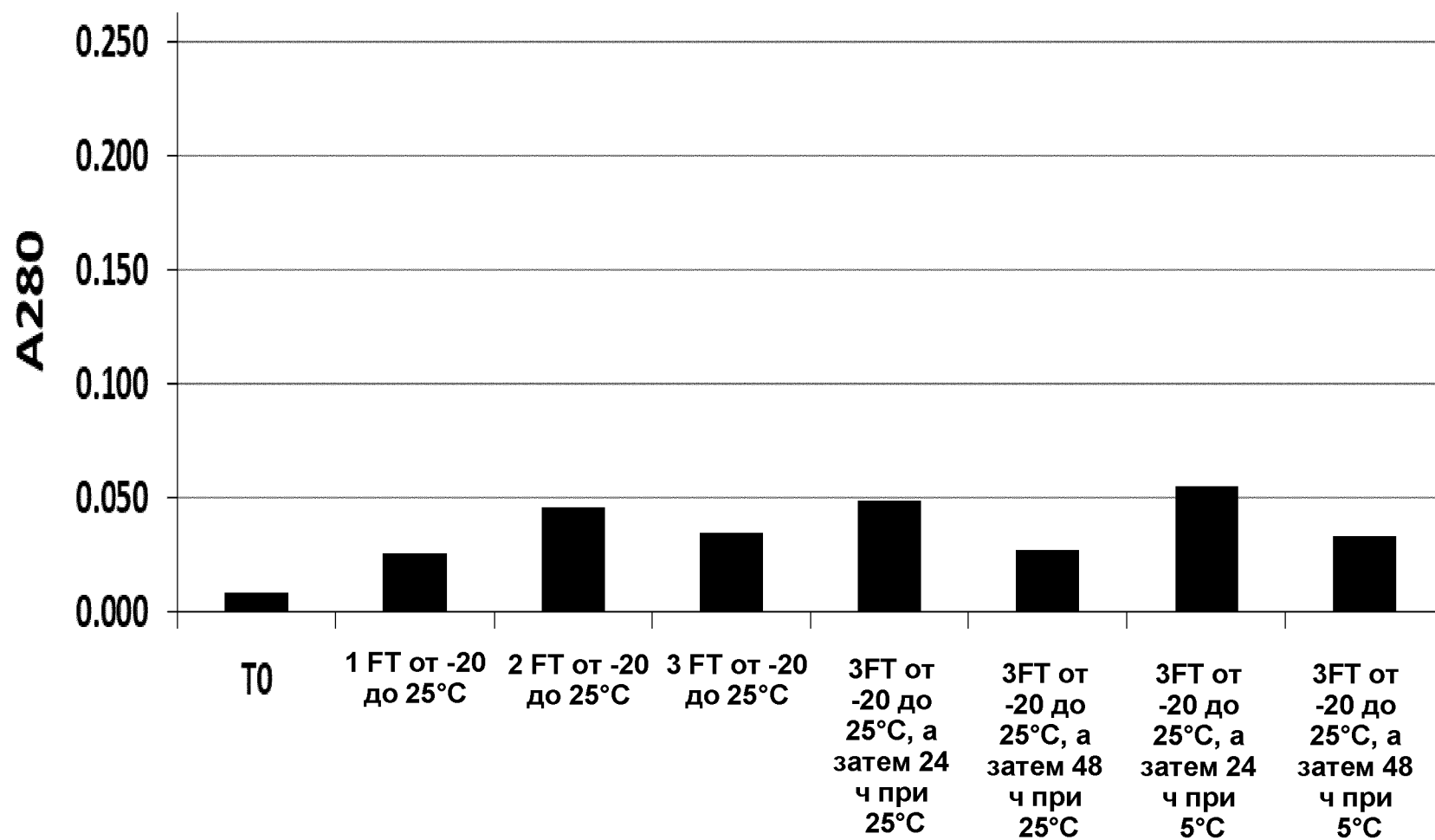
ФИГ. 10



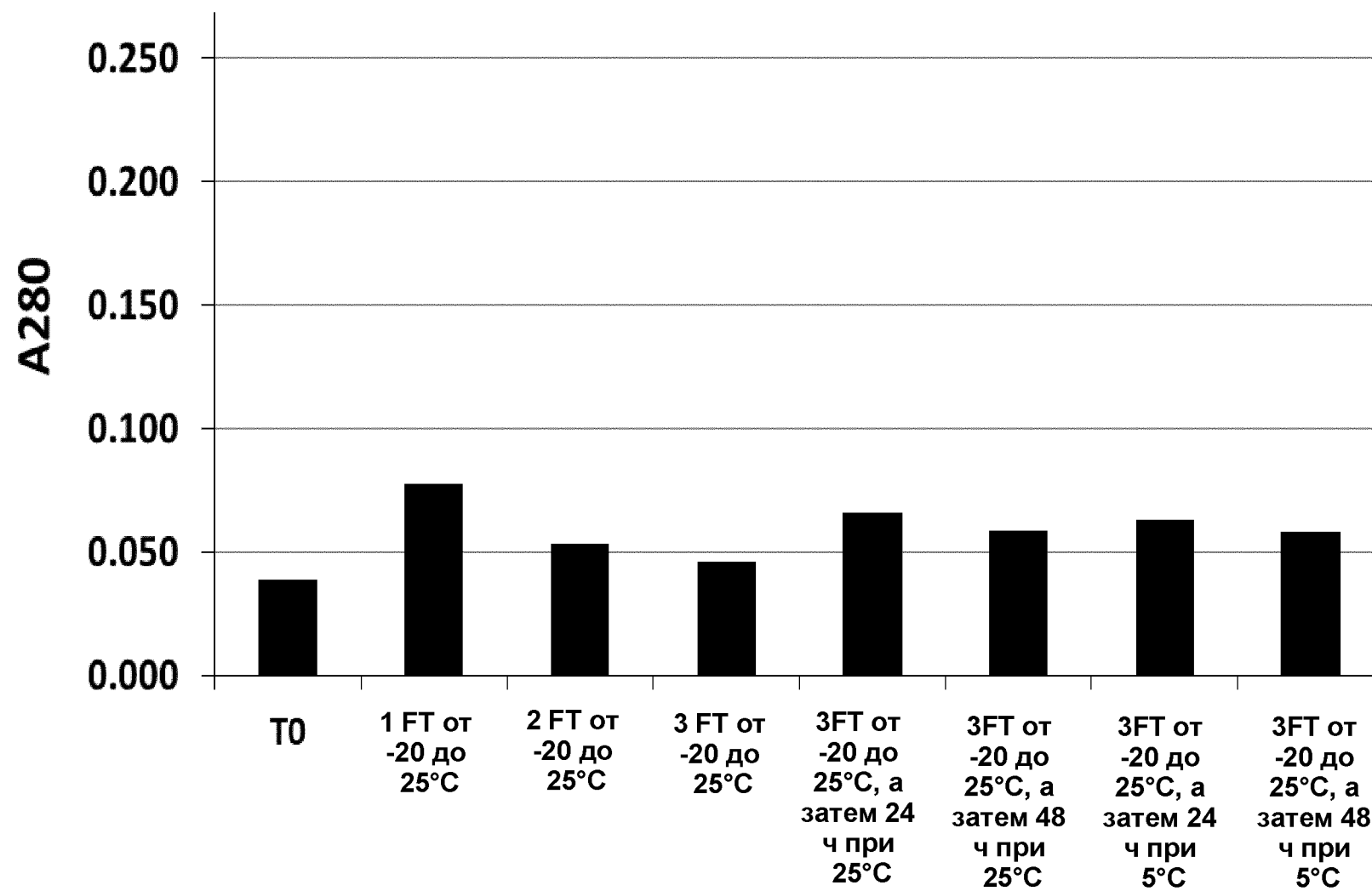
ФИГ. 11



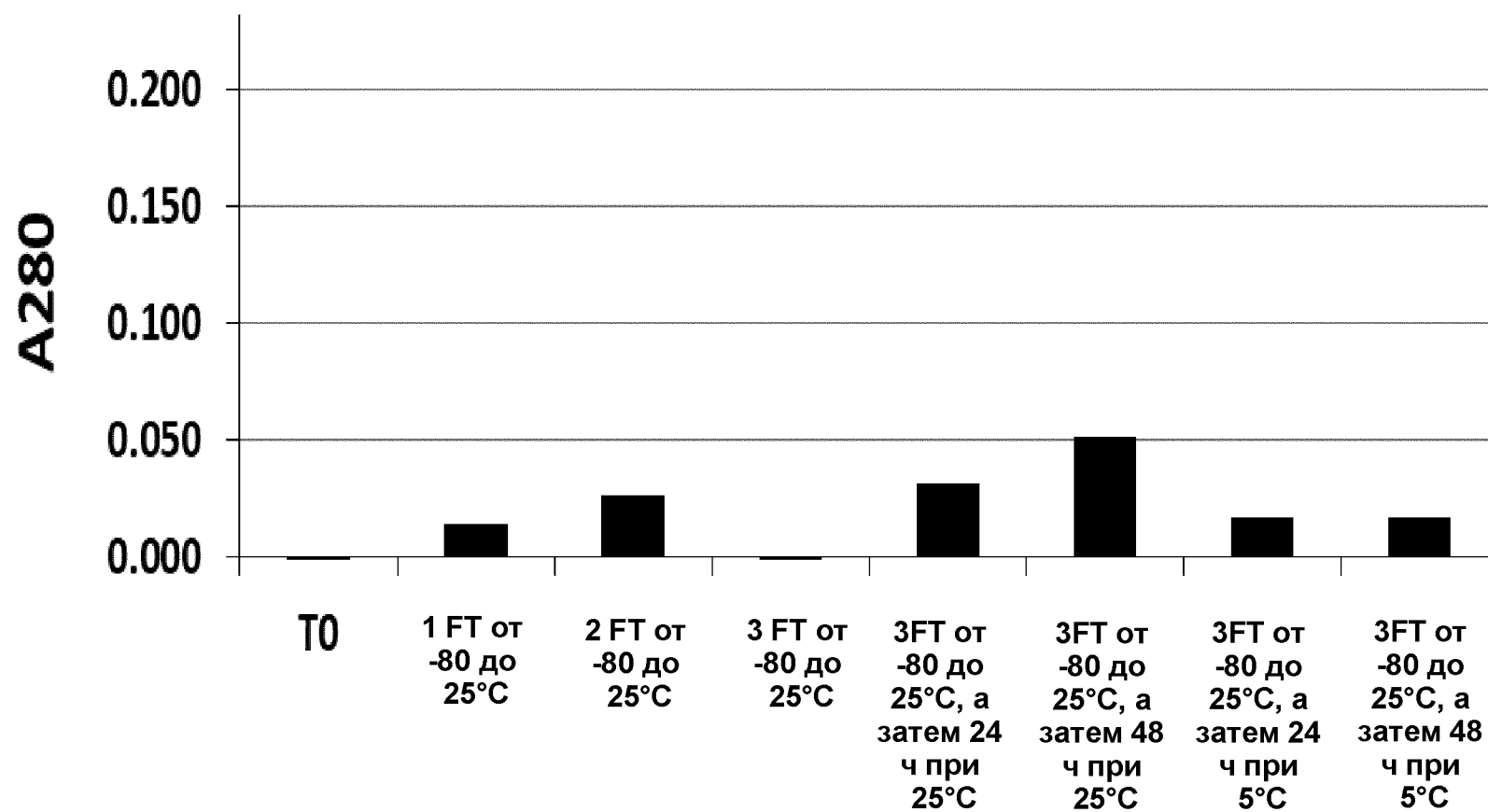
ФИГ. 12



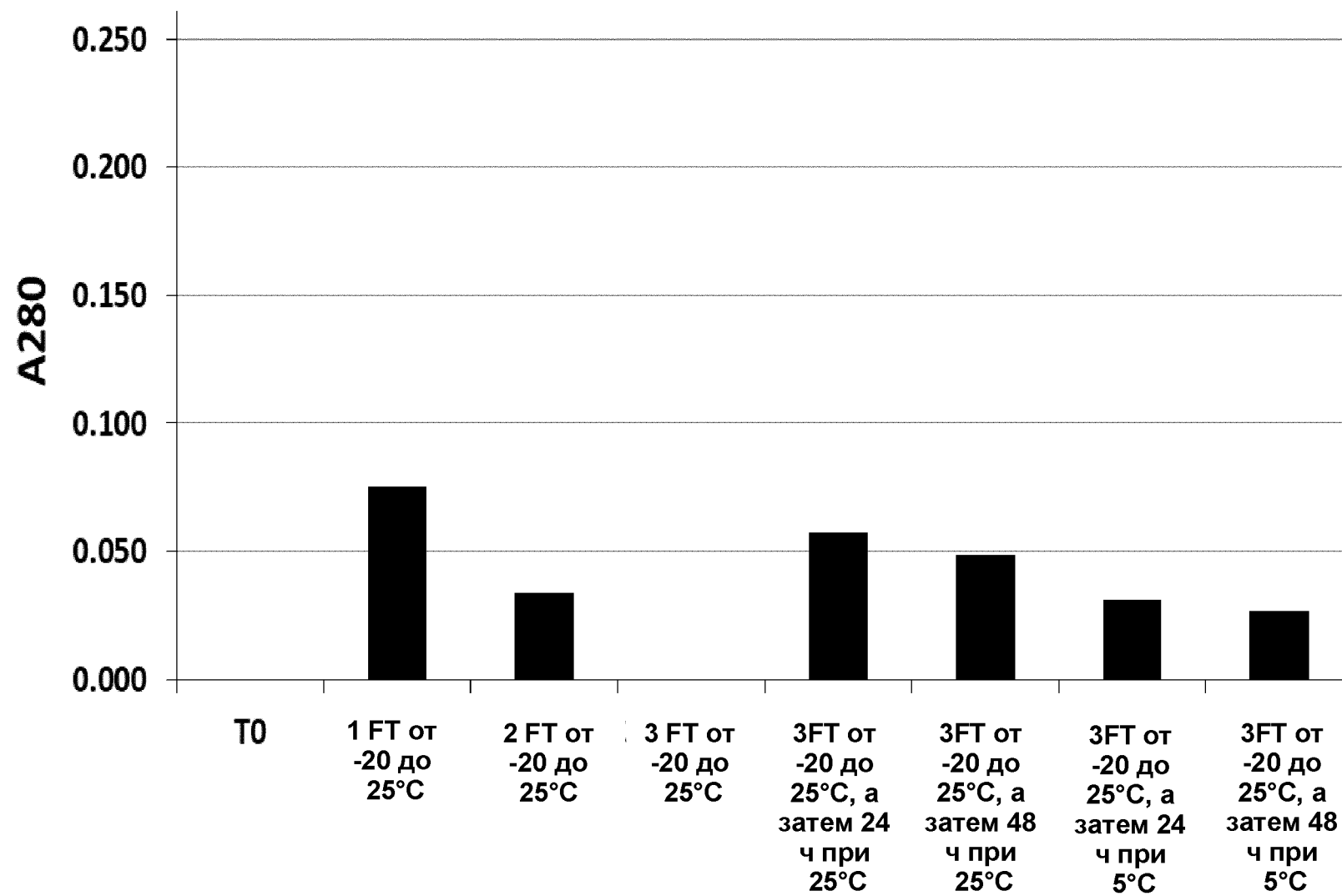
ФИГ. 13



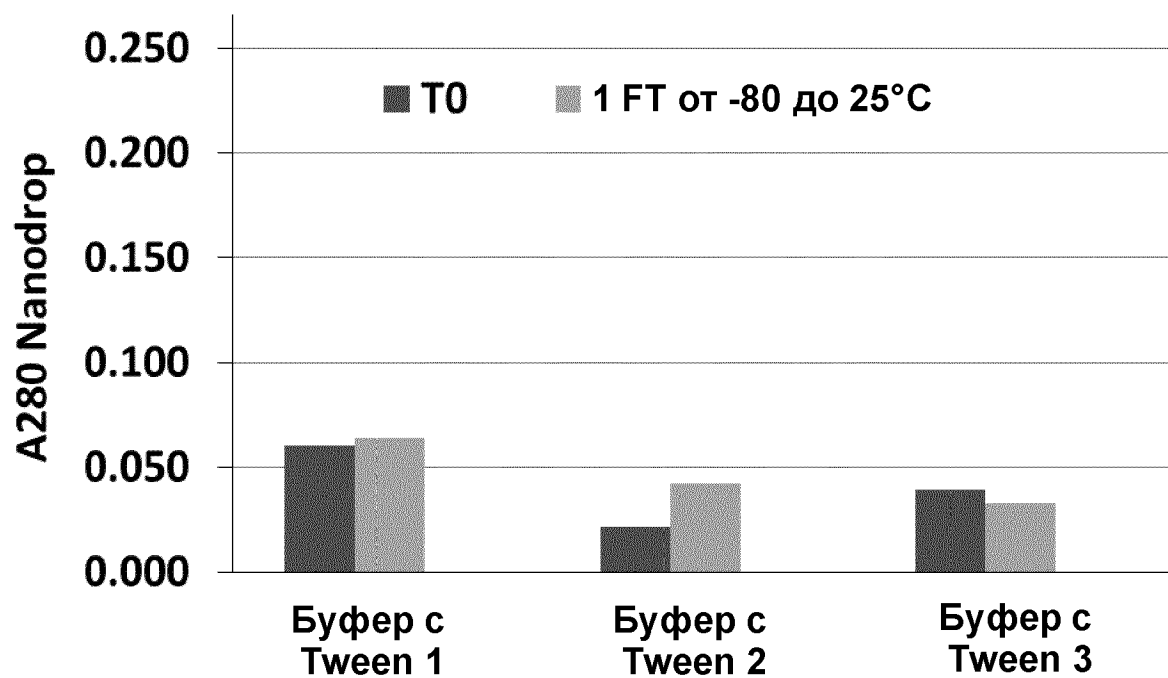
ФИГ. 14



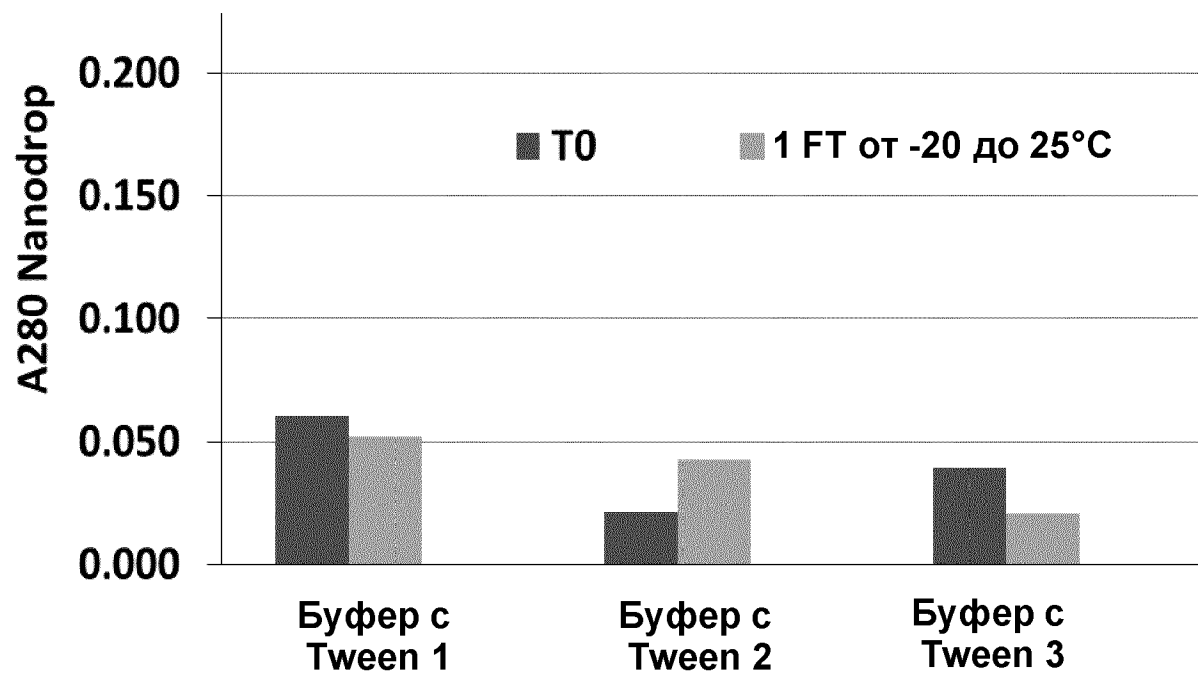
ФИГ. 15



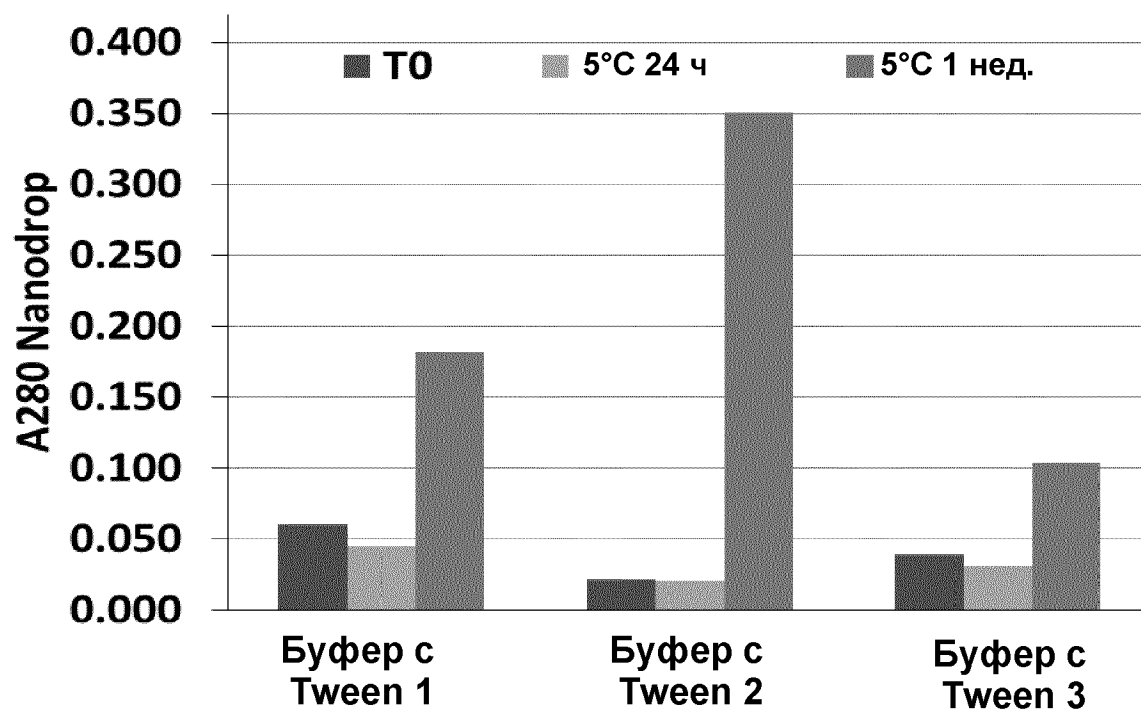
ФИГ. 16



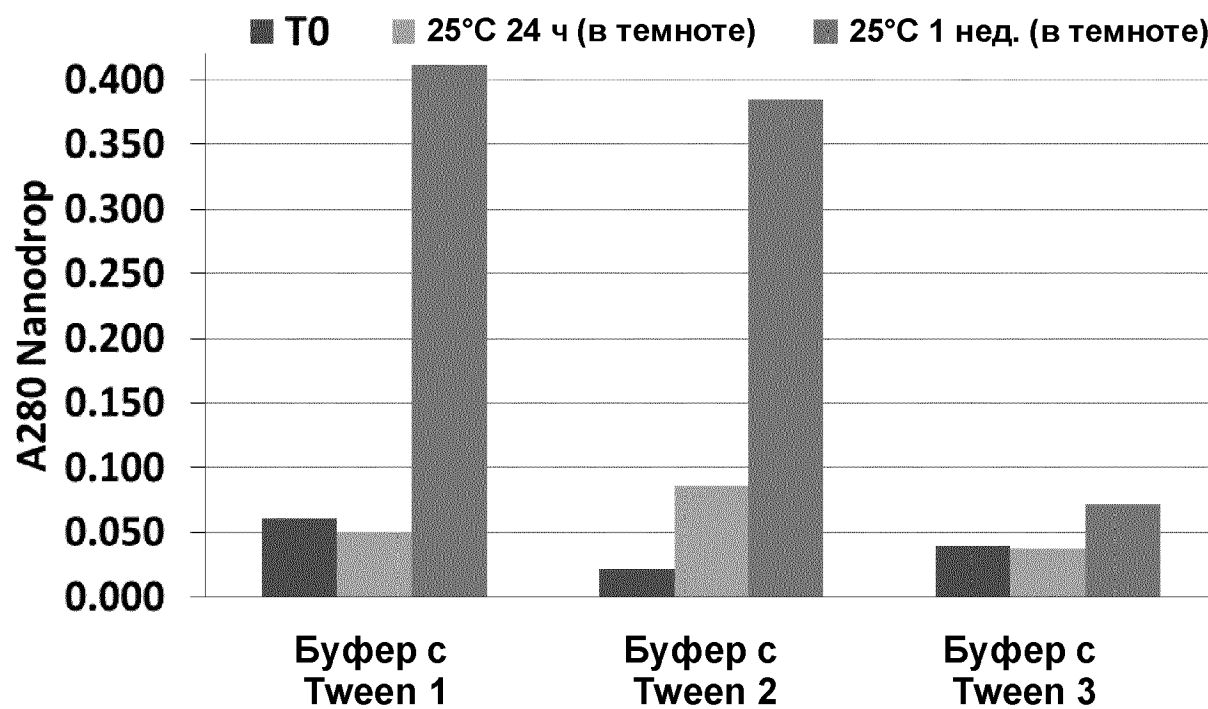
ФИГ. 17



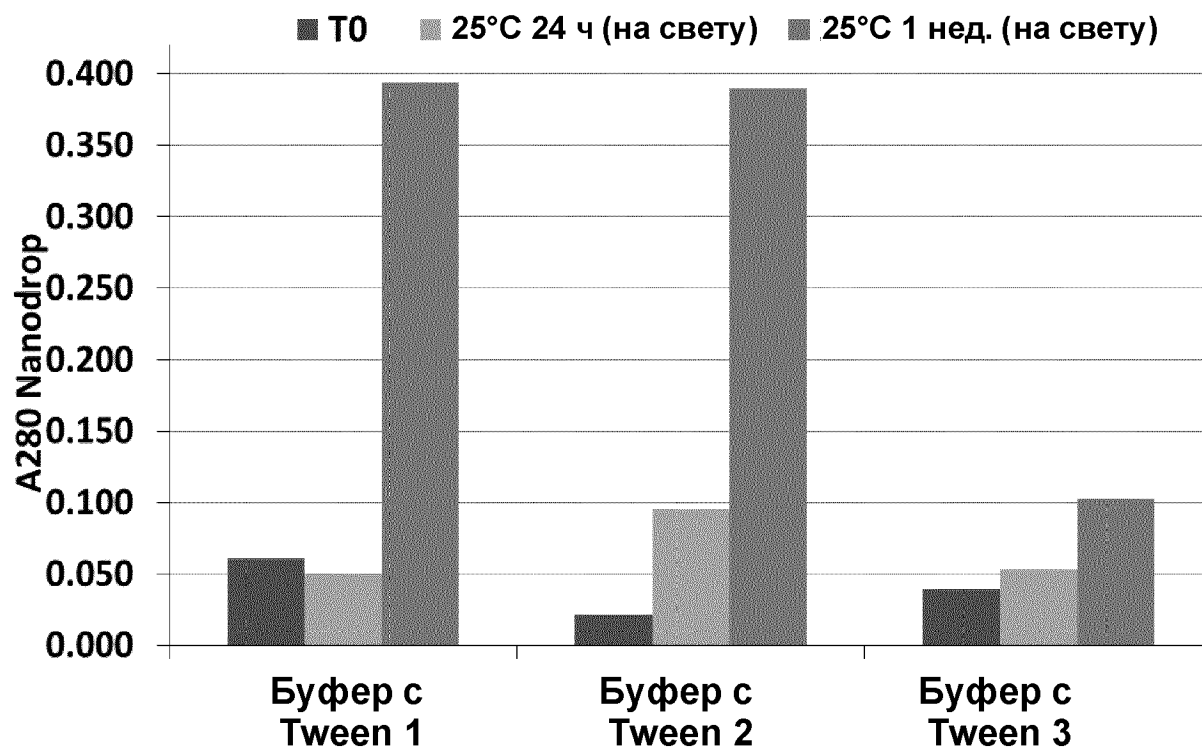
ФИГ. 18



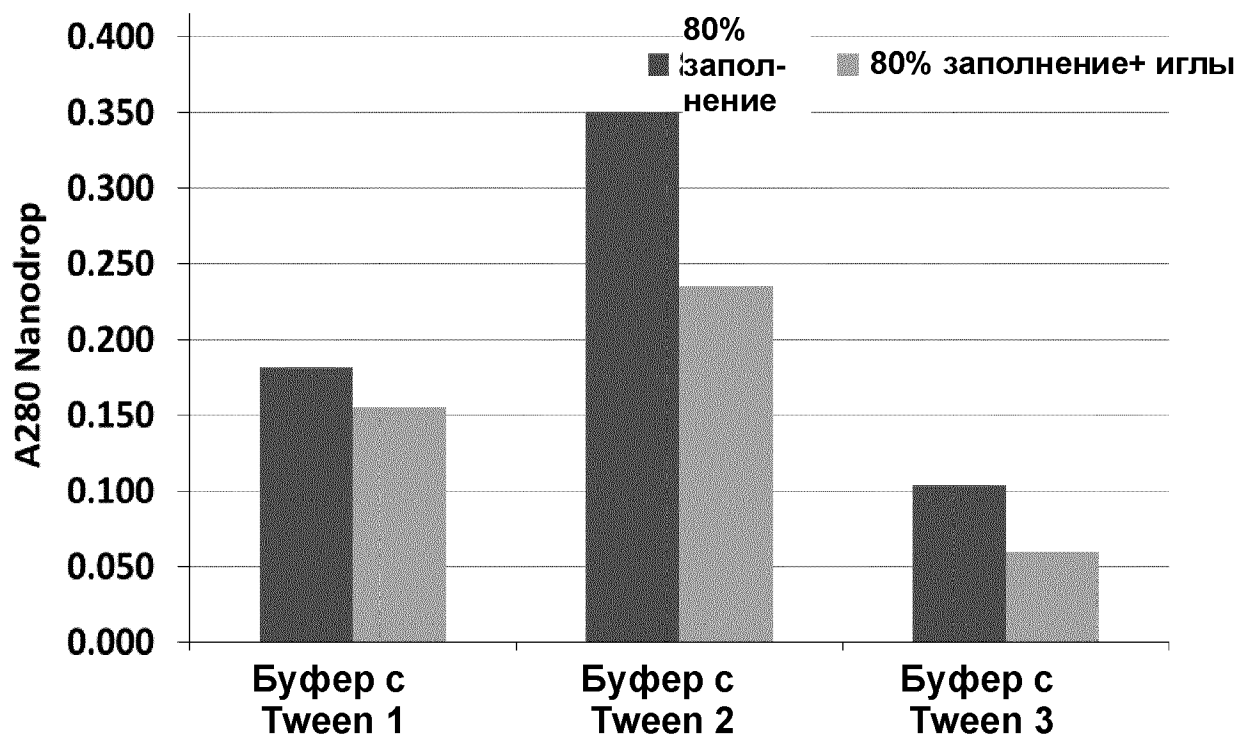
ФИГ. 19



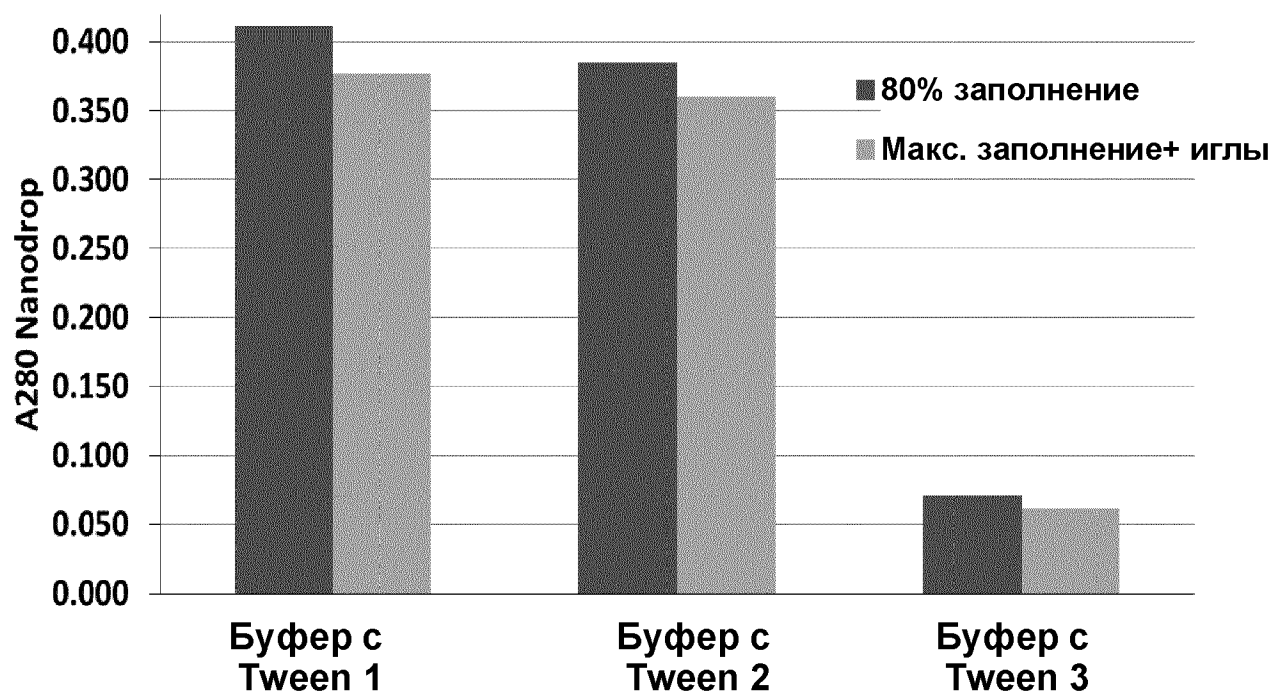
ФИГ. 20



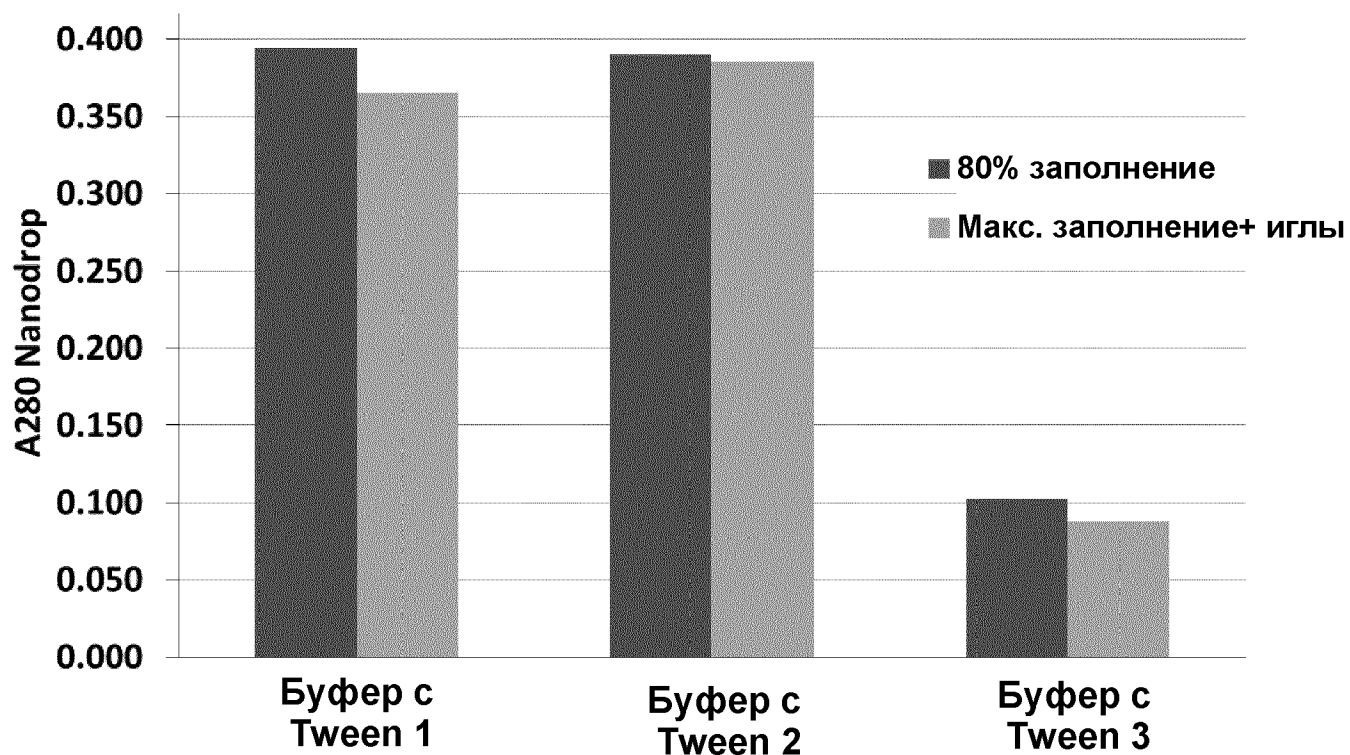
ФИГ. 21



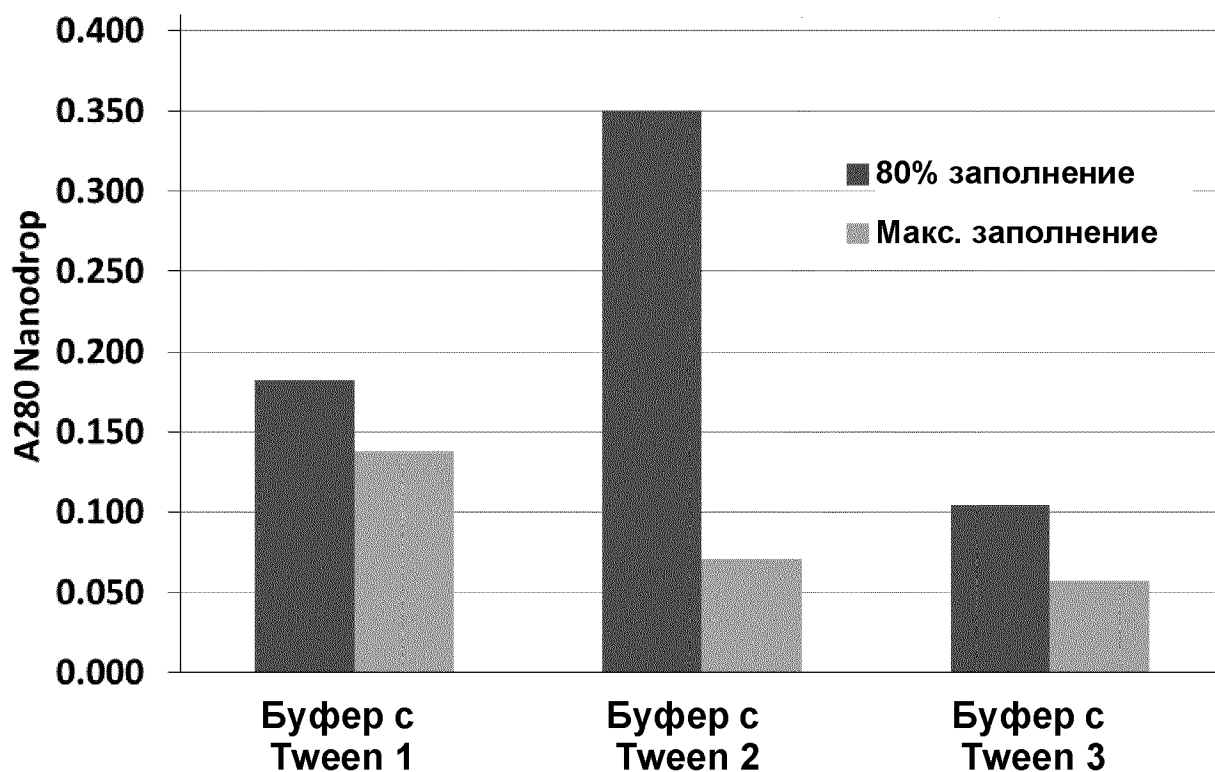
ФИГ. 22



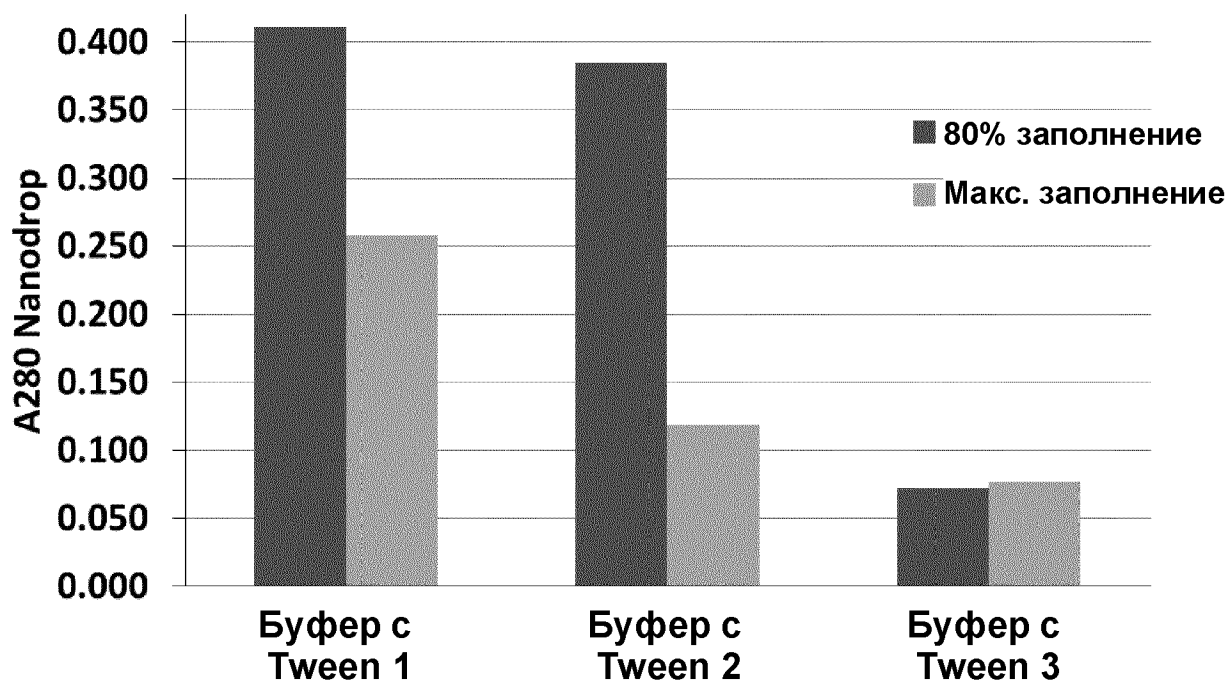
ФИГ. 23



ФИГ. 24

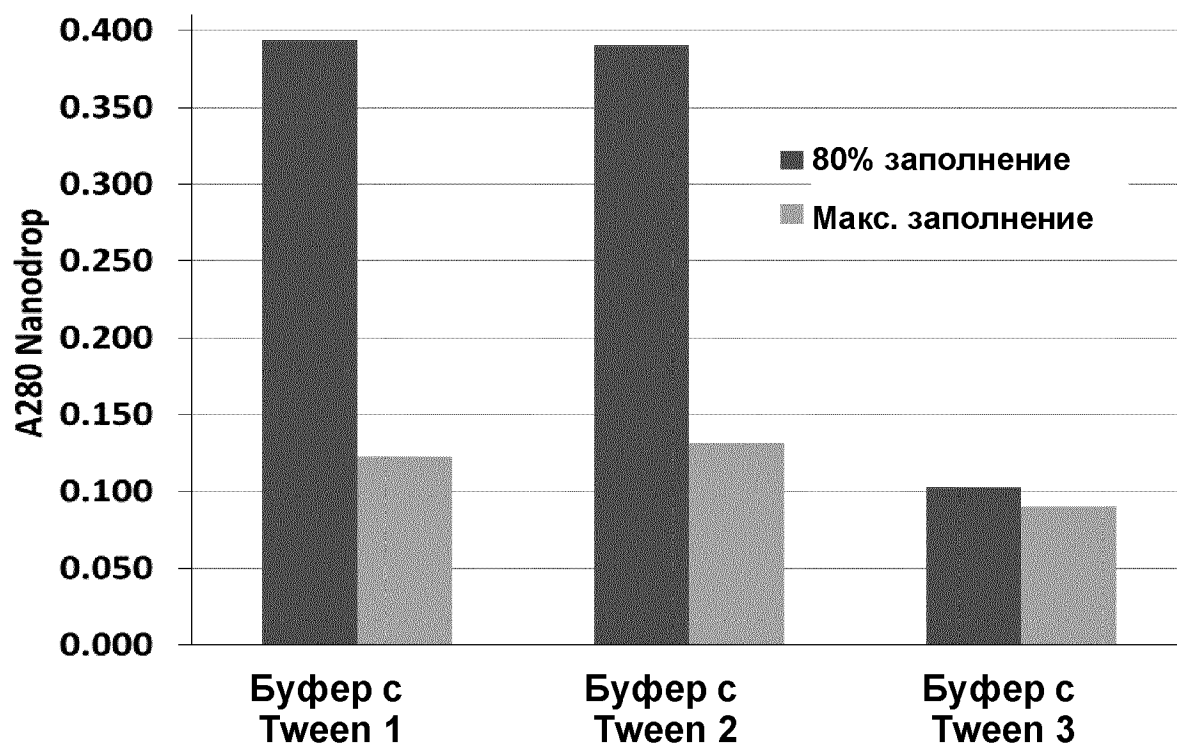


ФИГ. 25

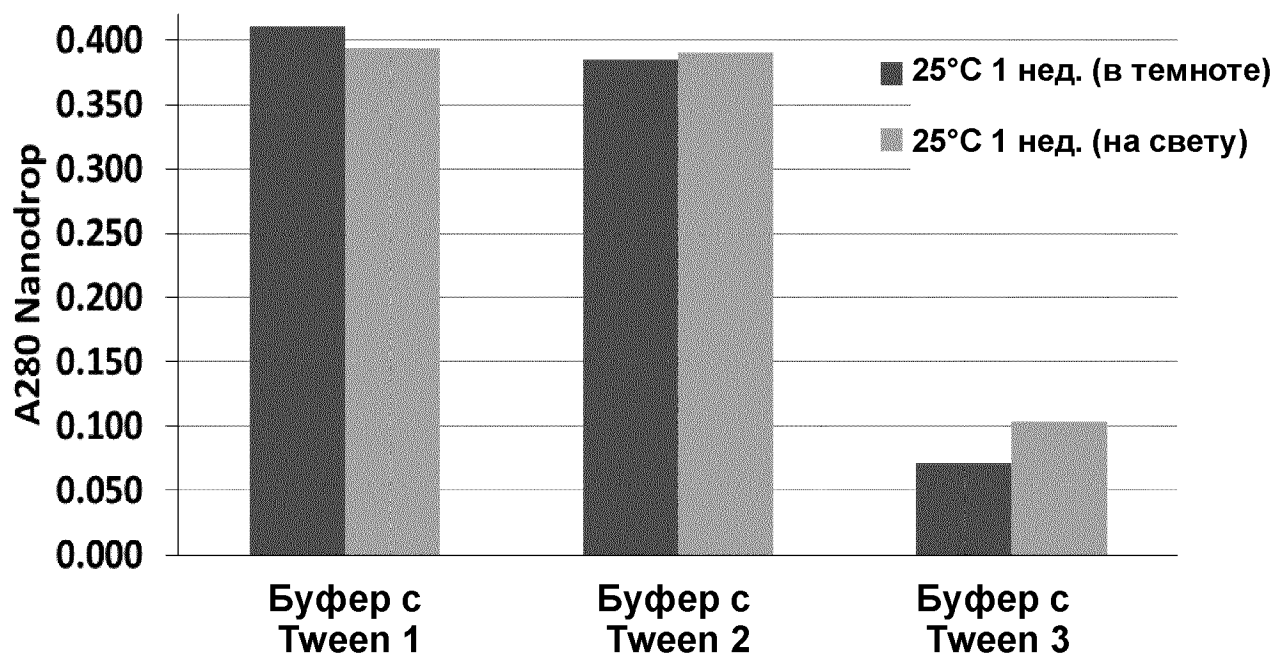


20/23

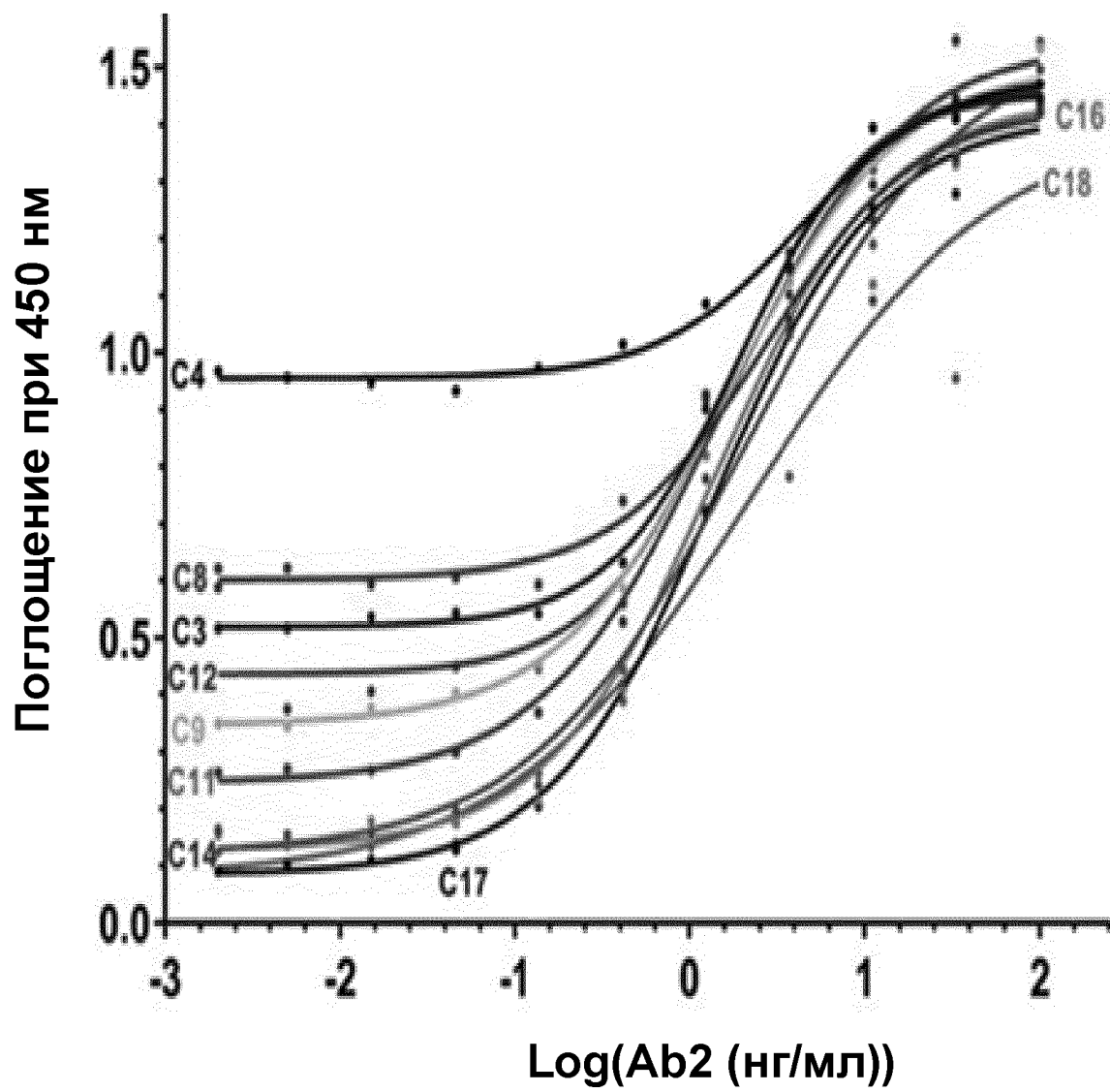
ФИГ. 26



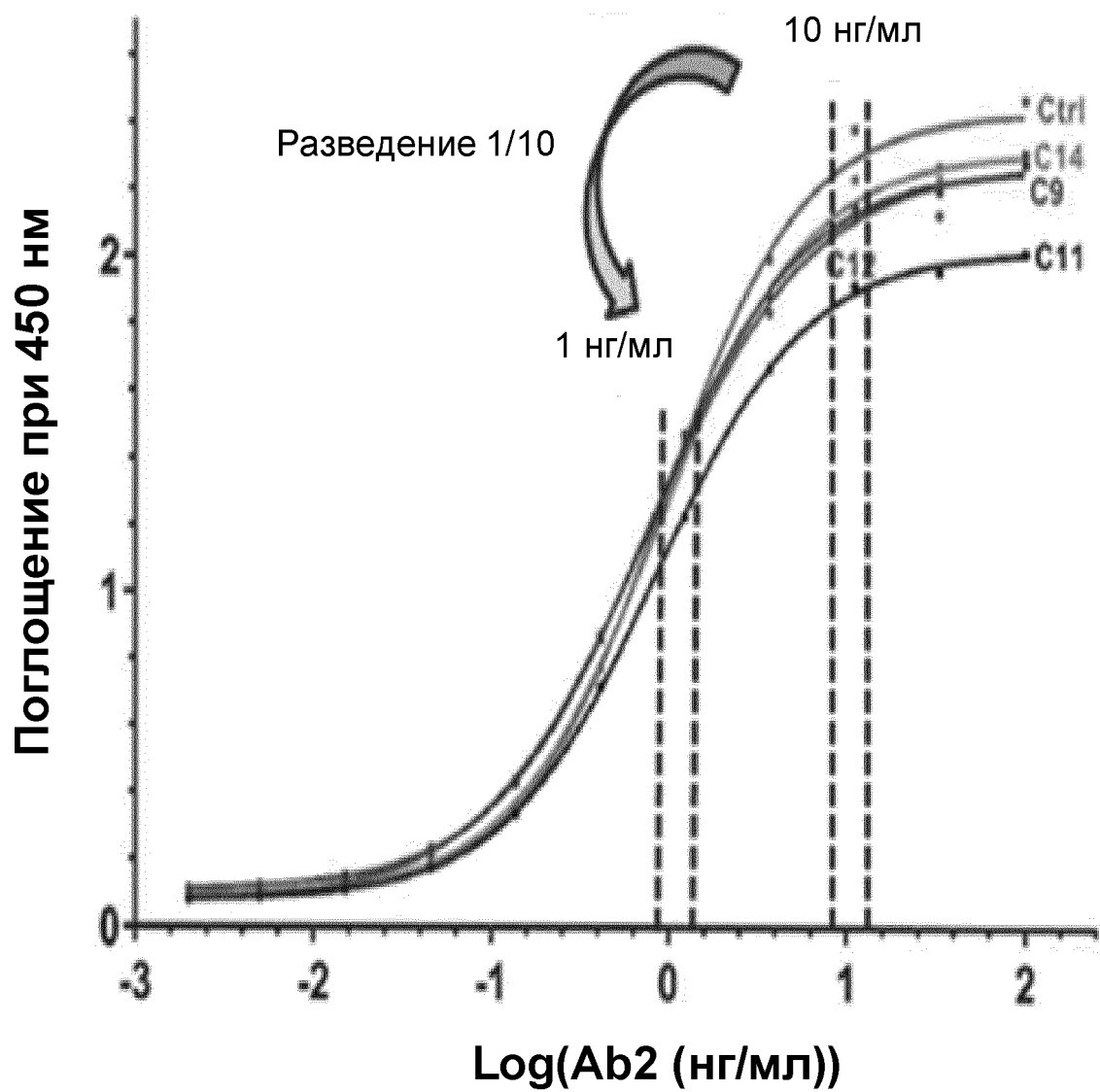
ФИГ. 27



ФИГ. 28



ФИГ. 29



ФИГ. 30

