

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293390** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.06

(22) Дата подачи заявки
2021.06.14

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(54) СТАБИЛЬНЫЙ СОСТАВ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CLEVER-1

(31) 20205624

(32) 2020.06.15

(33) FI

(86) PCT/FI2021/050442

(87) WO 2021/255336 2021.12.23

(71) Заявитель:

**ФАРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ОЙ
(FI)**

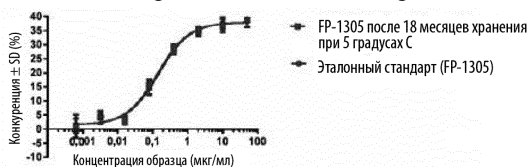
(72) Изобретатель:

Манделин Ями, Вайнио Марита (FI)

(74) Представитель:

Нагорных И.М. (RU)

(57) Изобретение относится к стабильным составам, содержащим антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), буфер и стабилизирующее средство. Кроме того, данное изобретение относится к стабильным составам на основе антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающих фрагментов для применения в лечении различных заболеваний и нарушений.



A1

202293390

202293390

A1

СТАБИЛЬНЫЙ СОСТАВ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CLEVER-1

Область техники

Данное изобретение относится к стабильным составам на основе антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающих фрагментов. Кроме того, данное изобретение относится к стабильным составам на основе антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающих фрагментов для применения в лечении различных заболеваний и нарушений.

Уровень техники

Человеческий CLEVER-1 (общий лимфатический эндотелиальный и сосудистый эндотелиальный рецептор-1) раскрыт в публикации WO 03/057130. CLEVER-1 также известен как Stabilin-1 или Feel-1. Биология CLEVER-1 также рассматривалась у Kzhyshkowska J. (2010), TheScientificWorldJOURNAL 10, 2039-2053, "Multifunctional receptor Stabilin-1 in homeostasis and disease". CLEVER-1 экспрессируется в лимфатических эндотелиальных клетках, некоторых эндотелиальных клетках сосудов, а также в альтернативно активированных иммуносупрессивных макрофагах, например, ассоциированных с опухолью макрофагах. Также ранее показано в публикации WO 2010/122217, что блокирование CLEVER-1 специфическими антителами уменьшает размер злокачественной опухоли и/или рост злокачественной опухоли. Ранее также было представлено, например, в публикации WO2017/182705, что блокирование CLEVER-1 превращает альтернативно активированные макрофаги из иммуносупрессивного (M2) фенотипа в провоспалительный (M1) фенотип.

В публикации WO 03/057130 также раскрывается, что CLEVER-1 опосредует связывание других типов лейкоцитов, таких как моноциты и гранулоциты, с HEV-подобными сосудами. Таким образом, за счет блокирования взаимодействия CLEVER-1 и клеток злокачественной опухоли стало возможным контролировать метастазирование, предотвращая попадание злокачественных клеток, связывающихся с CLEVER-1, в лимфатические сосуды, и, таким образом, предотвращать распространение злокачественной опухоли в лимфатические узлы.

Антитела против CLEVER-1 способны ингибировать экспрессию CLEVER-1 или связываться с CLEVER-1 для блокирования функции CLEVER-1 или блокирования взаимодействия CLEVER-1 с клетками, вовлеченными в этиологию заболевания.

Лекарственные средства на основе антител для применения людям могут несколько отличаться аминокислотной последовательностью их константных доменов или их

каркасными последовательностями в переменных доменах, но, как правило, они наиболее сильно отличаются последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR). Эти различия приводят к разной стабильности в растворе из-за разной чувствительности к вспомогательным средствам в растворе или к pH раствора. Кроме того, изменения в расположении аминокислот или изменения в одном или нескольких аминокислотных остатках могут привести к разной стабильности антител и чувствительности к специфичным в отношении последовательности путям разложения. Кроме того, антителам для применения в качестве лекарственного препарата у субъектов людей требуется хранение перед использованием, и, следовательно, также требуется стабильный состав, подходящий для хранения, не влияющий на функциональность антитела.

Сущность изобретения

Целью данного изобретения является обеспечение стабильного состава на основе антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающих фрагментов для фармацевтического применения, при этом состав на основе антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающих фрагментов будет стабильным при хранении и, следовательно, характеризуется достаточно длительным сроком хранения для клинического применения.

Кроме того, целью данного изобретения является обеспечение фармацевтического состава, содержащего антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающие фрагменты, с хорошей коллоидной и термодинамической стабильностью белка, низкой агрегацией при обработке и хранении и низкой денатурацией белка.

Кроме того, целью данного изобретения является обеспечение химически стабильного состава для сохранения функциональности последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR) антитела против CLEVER-1 и эффективности антитела против CLEVER-1 во время хранения.

Для достижения, среди прочего, представленных выше целей данное изобретение характеризуется тем, что представлено в независимых пунктах прилагаемой формулы изобретения. Некоторые предпочтительные варианты осуществления данного изобретения будут описаны в других пунктах формулы изобретения.

Варианты осуществления данного изобретения и преимущества, упомянутые в данном документе, относятся, где это применимо, как к фармацевтическому составу, так и к применениям в соответствии с данным изобретением, даже если это не всегда конкретно упоминается.

Типичный стабильный фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением содержит

- 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),

- 5-50 мМ буфера на основе гистидина в комбинации с 150-400 мМ трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства, при этом pH указанного фармацевтического состава находится в диапазоне 5,5-6,5, или

- 5-50 мМ Трис-буфера в комбинации с 100-200 мМ хлорида натрия в качестве стабилизирующего средства, при этом pH указанного фармацевтического состава находится в диапазоне 7,0-7,6, и

- 0,01-0,1% (масс./об.) полисорбата в качестве неионного поверхностно-активного вещества,

при этом антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) содержит(содержат) следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также

следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6).

Стабильный фармацевтический состав в одном варианте осуществления данного изобретения представляет собой жидкий состав, содержащий антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), стабилизирующее средство и буфер на основе гистидина с pH 5,5-6,5. В альтернативном варианте состав в соответствии с данным изобретением может находиться в лиофилизированной форме, полученной путем лиофилизации жидкой композиции, содержащей антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), стабилизирующее средство и буфер на основе гистидина с pH 5,5-6,5. Состав в другом варианте осуществления данного изобретения представляет собой жидкий состав, содержащий антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), стабилизирующее средство и Трис-буфер с pH 7,0-7,6. Кроме того, состав в одном варианте осуществления данного изобретения может находиться в лиофилизированной форме, полученной путем лиофилизации жидкой

композиции, содержащей антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), стабилизирующее средство и Трис-буфер с pH 7,0-7,6. Данное изобретение также относится к водной композиция, полученной путем восстановления лиофилизированного состава.

Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением подходит для применения в виде инфузии или инъекции. Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением особенно подходит для внутривенного введения.

Было отмечено, что химическая денатурация, по-видимому, является наиболее важным путем денатурации антител против CLEVER-1. Следовательно, в соответствии с данным изобретением избегают, в частности, химического разложения антитела против CLEVER-1 за счет обеспечения стабильной при хранении композиции. Поддержание стабильности антитела также имеет решающее значение для сохранения функциональности и эффективности антитела, что в данном случае достигается составом в соответствии с данным изобретением. Кроме того, фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением обеспечивает коллоидную и термодинамическую стабильность.

В соответствии с данным изобретением антитела против CLEVER-1 или их антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) включают в себя такие, которые специфически связываются с человеческим CLEVER-1 или способны ингибировать экспрессию CLEVER-1. Антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) могут быть использованы для повышения, усиления, стимуляции или активации иммунного ответа. Данное изобретение также относится к составу, содержащему антитела против CLEVER-1 или их антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) для применения в качестве лекарственного препарата. Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением может быть использован для устранения иммуносупрессии. Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением подходит для применения в лечении и/или предупреждении рака. Кроме того, фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением подходит для применения в лечении хронических инфекций и/или острых воспалительных инфекций, приводящих к истощению иммунитета. Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением также может быть использован в качестве адъюванта вакцины. Кроме того, фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением подходит для применения в лечении гиперхолестеринемии, дислипидемии и/или атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания.

Как правило, способ лечения в соответствии с данным изобретением включает введение пациенту эффективного количества фармацевтического состава в соответствии с данным изобретением. В определенных вариантах осуществления данного изобретения эффективное количество содержит дозу антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов) в диапазоне 0,1-50 мг/кг, предпочтительно в диапазоне 0,1-10 мг/кг.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 показаны аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей антитела против CLEVER-1 бексмарилимаб согласно предпочтительному варианту осуществления данного изобретения.

На фигурах 2-4 показаны результаты провокационного теста концентрации, а именно концентрация антитела, мутность и образование агрегатов до хранения и после хранения в течение одной недели при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ и при 35°C .

На фигурах 5-9 показаны результаты исследования форсированного разложения, при котором варианты состава подвергали стрессу вследствие воздействия светового излучения, стрессу вследствие воздействия нагревания с перемешиванием и стрессу вследствие воздействия замораживания/размораживания. Концентрация антитела, мутность, образование агрегатов, гетерогенность заряда антитела и окисленные продукты разложения анализировали до теста и после воздействия в стрессовых условиях.

На фигурах 10-16 показаны результаты исследования стабильности при ускоренном разложении при $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 25°C и 35°C , а именно концентрацию антитела, мутность, содержания агрегатов и фрагментов (SE-HPLC), гетерогенность заряда и окисленные продукты разложения анализировали до хранения, во время хранения и после 12 недель хранения.

На фигурах 17-18 показаны результаты исследования стабильности во время хранения и после 18 месяцев хранения при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

На фигуре 19 представлены изображения сканов компьютерной томографии на исходном уровне и при последующем наблюдении метастатических поражений у пациентов с лучшими ответами в клиническом исследовании фазы I/II.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение обеспечивает стабильные составы на основе антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов), которые являются биологически активными. Термин «биологически активный» относится к антителу или

фрагменту антитела, способному связывать CLEVER-1 и непосредственно или опосредованно оказывать биологический эффект. Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением содержит по меньшей мере фармакологически эффективное количество антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов), буфер и стабилизирующее средство. Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением содержит буфер на основе гистидина или буфер на основе Трис (2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диола). В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество и/или антиоксидант для дальнейшего улучшения стабильности состава.

Используемый в данном документе термин «антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающие фрагменты» относится к любой форме антитела или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов), которые проявляют желаемую биологическую активность. Антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) относятся к антителам и их фрагменту(ам), пептидам или т. п., которые способны ингибировать экспрессию CLEVER-1 или связываться с CLEVER-1 для блокирования функции CLEVER-1 или блокирования взаимодействия CLEVER-1 с клетками, вовлеченными в этиологию заболевания. CLEVER-1 ранее подробно раскрывался в публикации WO 03/057130. Термин «антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы)» используется в самом широком смысле, и следует учитывать, что он включает моноклональные, химерные, гуманизированные или приматизированные антитела, а также фрагменты антител и одноцепочечные антитела (например, Fab, Fv), при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

Составы в соответствии с данным изобретением включают антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), которые являются биологически активными. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 или фрагмент(ы) антитела, который(ые) способен(способны) связываться с CLEVER-1, способны связываться с конкретным эпитопом CLEVER-1 и непосредственно или опосредованно оказывать биологический эффект. В соответствии с данным изобретением антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) содержит следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи:

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYDPYYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также
 следующие последовательности определяющих комплементарность областей
 (CDR) легкой цепи:

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6).

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CLEVER-1. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 может представлять собой гуманизированное антитело, основанное на моноклональном антителе 3-372, раскрытом в патентной публикации WO 03/057130. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CLEVER-1, ранее представленное в патентной публикации WO2017/182705. В одном варианте осуществления данного изобретения гуманизированное антитело против CLEVER-1 содержит константные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG4. В одном варианте осуществления данного изобретения гуманизированное антитело против CLEVER-1 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления данного изобретения гуманизированное антитело против CLEVER-1 содержит константные области из тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого иммуноглобулина G4 (IgG4), а также переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления данного изобретения константные области из тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG4 могут содержать мутации, которые представляют собой одну или несколько консервативных аминокислотных замен. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) содержит(содержат) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 тяжелой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 легкой цепи. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи (SEQ ID NO:7) и легкой цепи (SEQ ID NO:8) антитела против CLEVER-1 согласно предпочтительному варианту осуществления данного изобретения также показаны на фигуре 1.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело изотипа

иммуноглобулина G4к бексмарилимаб (международное непатентованное наименование (INN)), раскрытое в WHO Drug Information, том 33, № 4, страницы 814-815 (2019), как предложенное INN, и в WHO Drug Information, том 34, № 3 (2020), страницы 699-700, как рекомендованное INN), или вариант бексмарилимаба, или антитело в биоаналоге бексмарилимаба. Антитело против CLEVER-1 бексмарилимаб представляет собой иллюстративное антитело, используемое в стабильном составе, описываемом в данном документе. Используемый в данном документе термин «бексмарилимаб» означает гуманизированное моноклональное антитело IgG4 со структурой, описанной в WHO Drug Information, том 33, № 4, страницы 814-815 (2019), и в WHO Drug Information, том 34, № 3 (2020). Гуманизированное моноклональное антитело IgG4 против CLEVER-1 бексмарилимаб содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 тяжелой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 легкой цепи. Антитело против CLEVER-1 бексмарилимаб содержит CDR легкой и тяжелой цепей, упомянутые выше (SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6). Последовательности, представленные под SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO:8, включают также переменные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела против CLEVER-1 бексмарилимаб, т. е. аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO: 10.

Биоаналог бексмарилимаба означает биологический препарат, который одобрен регулирующим органом в любой стране для продажи в качестве биоаналога бексмарилимаба. В одном варианте осуществления данного изобретения биоаналог бексмарилимаба содержит вариант бексмарилимаба в качестве лекарственного вещества. В одном варианте осуществления данного изобретения биоаналог бексмарилимаба характеризуется по сути той же аминокислотной последовательностью тяжелой и легкой цепей, что и бексмарилимаб. Используемый в данном документе термин «вариант бексмарилимаба» означает антитело, которое содержит последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, которые идентичны таковым в бексмарилимабе (SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно), за исключением наличия одной или нескольких консервативных аминокислотных замен в положениях, которые находятся за пределами CDR легкой цепи, и/или одной или нескольких консервативных аминокислотных замен, которые находятся за пределами CDR тяжелой цепи, например, в вариантных положениях, расположенных в каркасных областях или в константной области. Другими словами, бексмарилимаб и вариант бексмарилимаба содержат идентичные последовательности CDR, но отличаются друг от друга наличием консервативной аминокислотной замены в других положениях их полноразмерных последовательностей легкой и тяжелой цепей. Вариант бексмарилимаба по сути такой же, как бексмарилимаб в отношении аффинности связывания с CLEVER-1.

В одном варианте осуществления данного изобретения клеточная линия, продуцирующая антитело против CLEVER-1 бексмарилимаб (FP-1305), была депонирована 27 мая 2020 года в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, и имеет учетный номер DSM ACC3361. Объем данного изобретения не ограничивается депонированной культурой, поскольку депонированный вариант осуществления данного изобретения представлен в качестве простой иллюстрации одного аспекта изобретения, и любая функционально эквивалентная культура попадает в объем данного изобретения. Депонирование материала в данном случае не означает признание того, что содержащееся в данном документе письменное описание является недостаточным для обеспечения возможности осуществления на практике любого аспекта изобретения, в том числе его наилучшего варианта, и не должно толковаться как ограничение объема формулы изобретения конкретной иллюстрацией, которую он представляет.

В соответствии с данным изобретением стабильный состав может содержать 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов). В вариантах осуществления данного изобретения концентрация антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов) в стабильном фармацевтическом составе может находиться в диапазоне 1-100 мг/мл или 5-100 мг/мл. Фармацевтический состав в одном варианте осуществления данного изобретения может представлять собой концентрат, что означает, что перед введением его разбавляют до желаемой концентрации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтический состав может содержать 10-100 мг/мл или 20-100 мг/мл, предпочтительно 20-40 мг/мл и более предпочтительно 20-30 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением может представлять собой концентрат, который содержит 1-100 мг/мл, предпочтительно 10-100 мг/мл и более предпочтительно 20-40 мг/мл или 20-30 мг/мл или приблизительно 25 мг/мл, например, 22,5-27,5 мг/мл, антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов).

Стабильный фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением содержит буфер на основе гистидина или Трис-буфер. Термин «буфер» охватывает такие средства, которые поддерживают pH раствора в приемлемом диапазоне, т. е. обеспечивают достаточную буферную способность. Обычно pH измеряют при 25°C с

использованием стандартного прибора для измерения pH со стеклянной колбой. Используемый в данном документе фармацевтический состав, содержащий «буфер с pH X», относится к раствору фармацевтического состава с pH X, содержащему буфер, т. е. pH предназначен для обозначения pH раствора.

Стабильный состав в одном варианте осуществления данного изобретения содержит буфер на основе гистидина. pH состава в соответствии с данным изобретением, содержащего буфер на основе гистидина, доводят до диапазона 5,5-6,5. В одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав содержит буфер на основе гистидина и характеризуется pH от 5,5 до 6,2, предпочтительно от 5,8 до 6,2, и более предпочтительно pH составляет приблизительно 6,0. Было отмечено, что антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) характеризуются наивысшей коллоидной и термодинамической стабильностью в слабокислых буферных системах на основе гистидина. Указанные диапазоны pH также являются приемлемыми диапазонами для внутривенной инфузии или болюсной(ых) инъекции(ий). В одном варианте осуществления данного изобретения буфер на основе гистидина содержит L-гистидин. Кроме того, фармацевтический состав в одном варианте осуществления данного изобретения может содержать достаточное количество хлористоводородной кислоты и/или гидроксида натрия с буфером на основе гистидина, таким как L-буфер на основе гистидина, для доведения pH в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5 или от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,2, и предпочтительно характеризуется pH от приблизительно 5,8 до приблизительно 6,2 и более предпочтительно характеризуется pH приблизительно 6,0. L-гистидин/HCl в качестве буфера охватывает диапазоны pH от нейтральных до слабокислых. В одном варианте осуществления данного изобретения буфер содержит гистидин, предпочтительно L-гистидин, и HCl (хлористоводородную кислоту), при этом pH фармацевтического состава в соответствии с данным изобретением находится в диапазоне 5,5-6,5, предпочтительно 5,5-6,2 или 5,8-6,2.

В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 5-50 mM буфера на основе гистидина, предпочтительно 5-20 mM или 5-15 mM буфера на основе гистидина. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит приблизительно 10 mM буфера на основе гистидина, например, 5-15 mM, или 8-12 mM, или 9-11 mM, или 9,5-10,5 буфера на основе гистидина. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит буфер на основе гистидина без хлорида натрия.

В другом варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав содержит буфер на основе Трис (трис(гидроксиметил)аминометана), такой как Трис-основание или Трис-гидрохлорид, и характеризуется pH от 7,0 до 7,6, или от 7,2 до 7,6,

или от 7,3 до 7,5. В одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав содержит Трис-буфер и характеризуется рН приблизительно 7,4. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 5-50 мМ Трис-буфера, предпочтительно 5-20 мМ или 5-15 мМ Трис-буфера. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит приблизительно 10 мМ Трис-буфера, например, 5-15 мМ, или 8-12 мМ, или 9-11 мМ, или 9,5-10,5 Трис-буфера. Кроме того, фармацевтический состав в одном варианте осуществления данного изобретения может содержать достаточное количество хлористоводородной кислоты с Трис-буфером для приведения рН в диапазон от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,6, или от 7,2 до 7,6, или от 7,3 до 7,5, или рН приблизительно 7,4.

Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением дополнительно содержит стабилизирующее средство. Стабилизирующее средство используют для дальнейшего повышения коллоидной и термодинамической стабильности. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит трегалозу, пролин или маннит, предпочтительно трегалозу или пролин, в качестве стабилизирующего средства в комбинации с буфером на основе гистидина. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения стабилизирующее средство содержит трегалозу, такую как дигидрат трегалозы в комбинации с буфером на основе гистидина. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 150-400 мМ, предпочтительно 200-360 мМ трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства. В одном варианте осуществления данного изобретения стабилизирующее средство содержит 150-400 мМ, предпочтительно 200-360 мМ трегалозы, пролина или маннита. В одном варианте осуществления данного изобретения стабилизирующее средство содержит 220-340 мМ или 240-320 мМ трегалозы, пролина или маннита, предпочтительно трегалозы или пролина, более предпочтительно стабилизирующее средство содержит 260-300 мМ, или 270-290 мМ, или приблизительно 280 мМ трегалозы, пролина или маннита, предпочтительно трегалозы или пролина. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав содержит трегалозу, пролин или маннит в качестве стабилизирующего средства, предпочтительно трегалозу или пролин в качестве стабилизирующего средства и более предпочтительно трегалозу, такую как дигидрат трегалозы, в качестве стабилизирующего средства в комбинации с буфером на основе гистидина. В одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав содержит 150-400 мМ, предпочтительно 200-360 мМ трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства в комбинации с буфером на основе гистидина. В одном варианте осуществления данного

изобретения фармацевтический состав содержит 220-340 мМ или 240-320 мМ трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства, предпочтительно трегалозы или пролина в качестве стабилизирующего средства, более предпочтительно состав содержит 260-300 мМ, или 270-290 мМ, или приблизительно 280 мМ трегалозы, пролина или маннита, предпочтительно трегалозы или пролина, в качестве стабилизирующего средства. В одном варианте осуществления данного изобретения приблизительно 280 мМ стабилизирующего средства может составлять приблизительно 275-285 мМ трегалозы, пролина или маннита, предпочтительно трегалозы или пролина.

В одном варианте осуществления данного изобретения стабилизирующее средство содержит хлорид натрия, если состав содержит Трис-буфер. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит Трис-буфер и хлорид натрия в качестве стабилизирующего средства. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит Трис-буфер в комбинации с 100-200 мМ, предпочтительно 130-180 мМ или 140-160 мМ хлорида натрия в качестве стабилизирующего средства. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 100-200 мМ, предпочтительно 130-180 мМ или 140-160 мМ хлорида натрия в качестве стабилизирующего средства в комбинации с Трис-буфером. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит приблизительно 150 мМ хлорида натрия в качестве стабилизирующего средства в комбинации с Трис-буфером. В одном варианте осуществления данного изобретения приблизительно 150 мМ стабилизирующего средства может составлять приблизительно 145-155 мМ хлорида натрия в качестве стабилизирующего средства в комбинации с Трис-буфером.

Фармацевтический состав в одном варианте осуществления данного изобретения может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество, предпочтительно поверхностно-активное вещество содержит полисорбат, и более предпочтительно поверхностно-активное вещество содержит полисорбат 20. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит полисорбат и предпочтительно полисорбат 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 0,01-0,1% (масс./об.), предпочтительно 0,01-0,05% (масс./об.) неионного поверхностно-активного вещества. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 0,01-0,1% (масс./об.), предпочтительно 0,01-0,05% (масс./об.) полисорбата, предпочтительно полисорбата 20. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 0,01-0,03% (масс./об.) полисорбата, предпочтительно полисорбата 20. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит приблизительно 0,02% (масс./об.),

например, 0,015-0,025% (масс./об.) полисорбата, предпочтительно полисорбата 20. Добавление неионного поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 20, обеспечивает повышенную стабильность, что можно наблюдать как более низкую мутность во время хранения. Кроме того, неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20, используют в качестве поверхностно-активного вещества для облегчения процесса получения состава и для дополнительной стабилизации молекулы в жидком составе.

Фармацевтический состав в одном варианте осуществления данного изобретения может дополнительно содержать антиоксидант, предпочтительно антиоксидант содержит L-метионин для дальнейшего улучшения стабильности состава. Добавление метионина показало небольшое улучшение стабилизирующего эффекта. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 5-40 мМ, предпочтительно 15-25 мМ или 18-22 мМ антиоксиданта. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит 5-40 мМ, предпочтительно 15-25 мМ или 18-22 мМ L-метионина в качестве антиоксиданта. В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит приблизительно 20 мМ антиоксиданта, предпочтительно L-метионина. В одном варианте осуществления данного изобретения приблизительно 20 мМ антиоксиданта, предпочтительно L-метионина, может составлять 19-21 мМ или 19,5-20,5 мМ антиоксиданта, предпочтительно L-метионина.

В одном варианте осуществления данного изобретения стабильный фармацевтический состав содержит 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов), гистидин или Трис-буфер, стабилизирующее средство, поверхностно-активное вещество и антиоксидант. В одном варианте осуществления данного изобретения стабильный фармацевтический состав содержит 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов), буфер на основе гистидина, трегалозу или пролин в качестве стабилизирующего средства, поверхностно-активное вещество и антиоксидант. В другом варианте осуществления данного изобретения стабильный фармацевтический состав содержит 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов), Трис-буфер, хлорид натрия в качестве стабилизирующего средства, поверхностно-активное вещество и антиоксидант.

В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит:

- (i) 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),
- (ii) 5-50 мМ буфера на основе гистидина,

(iii) 150-400 мМ трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства,

(iv) 0,01-0,1% (масс./об.) полисорбата 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества и

(v) 5-40 мМ L-метионина в качестве антиоксиданта,

при этом pH указанной композиции составляет от 5,5 до 6,5, предпочтительно от 5,8 до 6,2, и

при этом антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) содержит(содержат) следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также

следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6),

и предпочтительно антитело против CLEVER-1 представляет собой антитело против CLEVER-1, содержащее SEQ ID NO: 7 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления данного изобретения состав содержит:

(i) 20-40 мг/мл или 20-30 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),

(ii) 5-20 мМ или 5-15 мМ буфера на основе гистидина,

(iii) 200-360 мМ, предпочтительно 240-320 мМ или 260-290 мМ трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства,

(iv) 0,01-0,1% (масс./об.), предпочтительно 0-01-0,05% (масс./об.) полисорбата 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества и

(v) 5-40 мМ L-метионина в качестве антиоксиданта,

при этом pH указанной композиции составляет от 5,5 до 6,5, предпочтительно от 5,8 до 6,2, и

при этом антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также

следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6),

и предпочтительно антитело против CLEVER-1 представляет собой антитело против CLEVER-1, содержащее SEQ ID NO: 7 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения состав содержит:

(i) 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),

(ii) 5-50 мМ Трис-буфера, предпочтительно 5-20 мМ или 5-15 мМ Трис-буфера,

(iii) 100-200 мМ, предпочтительно 130-180 мМ хлорида натрия в качестве стабилизирующего средства,

(iv) 0,01-0,1% (масс./об.), предпочтительно 0-01-0,05% (масс./об.) полисорбата 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества и

(v) 5-40 мМ L-метионина в качестве антиоксиданта,

при этом рН указанной композиции составляет от 7,0 до 7,6, и

при этом антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также

следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6),

и предпочтительно антитело против CLEVER-1 представляет собой антитело против CLEVER-1, содержащее SEQ ID NO: 7 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 8.

В одном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения состав в соответствии с данным изобретением содержит

(i) 1-100 мг/мл, антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),

(ii) 10 mM буфера на основе L-гистидина/HCl,

(iii) 280 mM трегалозы или пролина, предпочтительно 280 mM трегалозы или дигидрата трегалозы в качестве стабилизирующего средства,

(iv) 0,02% (масс./об.) полисорбата 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества и

(v) 20 mM L-метионина в качестве антиоксиданта,

при этом pH указанной композиции составляет от 5,8 до 6,2, и

при этом антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также

следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6),

и предпочтительно антитело против CLEVER-1 представляет собой антитело против CLEVER-1, содержащее SEQ ID NO: 7 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 8.

Более предпочтительно, в одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав содержит

(i) 20-40 мг/мл или 20-30 мг/мл или 25 мг/мл $\pm$ 2,5 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),

(ii) 10 mM буфера на основе L-гистидина/HCl,

(iii) 280 mM трегалозы или пролина, предпочтительно 280 mM трегалозы или дигидрата трегалозы в качестве стабилизирующего средства,

(iv) 0,02% (масс./об.) полисорбата 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества и

(v) 20 mM L-метионина в качестве антиоксиданта,

при этом pH указанной композиции составляет от 5,8 до 6,2, и

при этом антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYPYYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также

следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6),

и предпочтительно антитело против CLEVER-1 представляет собой антитело против CLEVER-1, содержащее SEQ ID NO: 7 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 8.

Состав в соответствии с данным изобретением предпочтительно представляет собой жидкий состав.

В типовом варианте осуществления данного изобретения жидкий состав на основе антитела может быть получен путем использования антитела против CLEVER-1 в жидкой форме и замены его буфером на желаемый состав. В этом варианте осуществления данного изобретения отсутствует стадия лиофилизации. Лекарственное вещество в конечном буфере концентрируют до желаемой концентрации. К раствору добавляют вспомогательные средства, такие как дигидрат трегалозы и полисорбат 20, и раствор разбавляют с использованием соответствующего буфера до конечной концентрации белка. Готовое составленное лекарственное вещество фильтруют с использованием фильтров 0,22 мкм и помещают в конечный контейнер (например, стеклянные флаконы).

В одном варианте осуществления данного изобретения состав также может представлять собой лиофилизированный состав, т. е. лиофилизат. Термин «лиофилизат» относится к продукту лиофилизации. Термин «лиофилизировать» в отношении фармацевтических составов в соответствии с данным изобретением предназначен для обозначения сушки замораживанием раствора состава. Лيوфилизированные составы терапевтических белков могут обеспечивать такие преимущества, как лучшая химическая стабильность. Лيوфилизированный состав также может быть восстановлен при различных концентрациях в зависимости от клинических факторов, таких как способ введения или дозировка. Термин «восстановление» относится к растворению лиофилизата для получения водного раствора.

Было отмечено, что фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением стабилизирует антитело против CLEVER-1 или их антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) против разложения во время хранения. В одном варианте осуществления данного изобретения состав, содержащий антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), характеризуется стабильностью при хранении при 2-8°C. Может быть достигнута хорошая стабильность при высоких концентрациях, даже при концентрациях 100 мг/мл антител против CLEVER-1 или их антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов). «Стабильный» фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением представляет собой фармацевтический состав, содержащий антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), в котором не наблюдалось значительных изменений при температуре охлаждения 2-8°C в течение по меньшей мере 3 месяцев. Было отмечено, что состав в соответствии с данным изобретением стабилен при хранении при температуре 2-8°C в течение по меньшей мере 18 месяцев или 24 месяцев. Фармацевтический состав считают стабильным при хранении при температуре 2-8°C в течение даже по меньшей мере 30 месяцев и даже на протяжении периода 36 месяцев.

Антитело «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтическом составе, если оно не показывает значительного усиления агрегации и/или денатурации, что измерено с помощью SE-HPLC, и/или не показывает значительного усиления цвета и/или прозрачности. Антитело «сохраняет свою химическую стабильность» в фармацевтическом составе, если оно не показывает значительного химического изменения. Химическая стабильность может быть оценена путем выявления и количественного определения химически измененных форм белка. Антитело «сохраняет свою биологическую активность» в фармацевтическом составе, если биологическая активность антитела в данный момент времени находится в пределах заданного диапазона биологической активности, проявляемой во время получения фармацевтического состава. Биологическая активность антитела может быть определена, например, с помощью анализа связывания антигена. Типичными приемлемыми критериями для стабильности являются следующие. Как правило, агрегируется не более чем приблизительно 10%, предпочтительно приблизительно 5%, мономеров антитела, как измерено с помощью эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC). Фармацевтический состав на основе антитела является бесцветным, или прозрачным, или слегка опалесцирующим при визуальном анализе. Концентрация изменяется не более чем на +/- 10%. Как правило, наблюдают разложение или варианты изменения на не более чем приблизительно 10%,

предпочтительно приблизительно 5%. Эффективность обычно находится в пределах 50-200% от эталонной.

Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением может быть введен пациенту. Состав в одном варианте осуществления данного изобретения предназначен для внутривенного или внутриопухолевого введения. Состав в жидкой форме может быть разбавлен перед введением. Состав в лиофилизированной форме может быть восстановлен при различных концентрациях перед введением дозы. В одном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав вводят внутривенно. Его можно вводить путем внутривенной инфузии или болюсной инъекции. Термин «внутривенное» или «i.v.» введение относится к введению в кровеносные сосуды.

Состав в соответствии с данным изобретением, содержащий антитело против CLEVER-1 или его фрагмент(ы) антитела, может быть использован в качестве лекарственного препарата.

Состав в соответствии с данным изобретением, содержащий антитело против CLEVER-1 или его фрагмент(ы) антитела, может быть использован для устранения иммуносупрессии, индуцированной опухолью или антигеном. Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением подходит для применения в лечении или предупреждении рака. В одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав может уменьшать размеры опухолей, или ингибировать их рост, или предотвращать метастазирование. Фармацевтический состав применим ко всем формам рака. Можно лечить любую доброкачественную или злокачественную опухоль или метастазирование злокачественной опухоли. Также можно лечить лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

Состав в соответствии с данным изобретением, содержащий антитело против CLEVER-1 или его фрагмент(ы) антитела, также может быть использован для лечения или предупреждения хронических инфекций или острых воспалительных инфекций, приводящих к истощению иммунитета, при этом модуляция фенотипа макрофагов достигается за счет антитела против CLEVER-1.

Фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением также может быть использована в качестве адъюванта вакцины. Антитело против CLEVER-1 обеспечивает реполяризацию макрофагов и, таким образом, устраняет или по меньшей мере уменьшает подавление иммунитета против антигенов вакцины.

Кроме того, фармацевтический состав в соответствии с данным изобретением подходит для применения в лечении гиперхолестеринемии, дислипидемии и/или

атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания, поскольку также было обнаружено, что антитела, способные связываться с CLEVER-1, также обладают способностью ингибировать и/или блокировать модифицированные липопротеины низкой плотности, особенно ацетилированные липопротеины низкой плотности (acLDL), захват CLEVER-1 и превращение в пенистую клетку, т. е. предшественник атеросклеротических бляшек.

Термин «лечение» или «лечащий» следует понимать как относящийся к полному излечению заболевания, а также к ослаблению или облегчению указанного заболевания. Термин «предупреждение» следует понимать как относящийся к полному предупреждению, профилактике, а также к снижению риска индивидуума заболеть указанным заболеванием или нарушением.

Выбранная доза антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов) должна быть фармакологически эффективной и, следовательно, достаточной для получения желаемого терапевтического результата, например, для уменьшения роста злокачественной опухоли, и/или ингибирования метастатического распространения, и/или блокирования негативной регуляции Т-клеток при раке, хронической инфекции, инфекционных заболеваниях или других состояниях истощения иммунитета. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 вводят в диапазоне 0,1-50 мг/кг, предпочтительно 0,1-30 мг/кг или 0,1-10 мг/кг в соответствии с массой тела пациента. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело против CLEVER-1 вводят в диапазоне 0,3-10 мг/кг и предпочтительно 0,3-3 мг/кг в соответствии с массой тела пациента. В одном осуществлении данного изобретения способ лечения рака, хронической инфекции, инфекционных заболеваний или других состояний истощения иммунитета включает введение фармацевтического состава в соответствии с данным изобретением, предпочтительно в количестве 0,1-50 мг/кг, предпочтительно 0,1-30 мг/кг или 0,1-10 мг/кг в соответствии с массой тела пациента.

Состав в соответствии с данным изобретением, содержащий антитело против CLEVER-1 или его фрагмент(ы) антитела, может быть использован отдельно или в комбинации с другими средствами или фармацевтическими продуктами. В одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтический состав, содержащий антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы), используют в лечении рака отдельно или в комбинации с другими иммунотерапевтическими средствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данной экспериментальной части исследовали и подтверждали стабильность фармацевтического состава в соответствии с данным изобретением, содержащего антитело против CLEVER-1.

Лекарственное средство

FP-1305 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CLEVER-1 изотипа иммуноглобулина G4к, продуцируемое в клетках CHO. Более подробно, FP-1305 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CLEVER-1 бексмарилимаб (международное непатентованное наименование (INN)), раскрытое в WHO Drug Information, том 33, № 4, страницы 814-815 (2019), как предложенное INN, и в WHO Drug Information, том 34, № 3 (2020), страницы 699-700, как рекомендованное INN). Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей FP-1305 содержат SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8 (представленные также на фиг. 1). FP-1305 содержит последовательности CDR SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:6. Клеточная линия для получения FP-1305 депонирована под учетным номером DSM ACC3361 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ.

Аналитические способы

Аналитические способы для оценки стабильности состава включают тест динамического лазерного светорассеяния (DLS), нанодифференциальную сканирующую калориметрию (nanoDSC), многоугловое светорассеяние с градиентом состава (CG-MALS), SE-HPLC (эксклюзионную хроматографию), RP-HPLC (обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию) восстановленных образцов и капиллярный зонный электрофорез (CZE). Используют стандартные способы упомянутого выше анализа.

DLS используют для определения взаимодействий белок-белок. При более высокой концентрации макромолекул взаимодействия между соседними частицами приводят к неидеальному поведению диффузии (нарушается межмолекулярная стабильность). Это может быть описано вторым гидродинамическим вириальным коэффициентом k_D . Значение k_D описывает склонность к неспецифической молекулярной ассоциации при данном наборе условий раствора. Температура начала термической денатурации (T_{onset}), т. е. начальная точка разворачивания (температура начала денатурации), также может быть определена с помощью DLS.

NanoDSC специально разработан для определения температуры денатурации (T_{onset}) и энтальпии термической денатурации белков и других макромолекул в растворе с универсальностью и точностью для проведения скрининга молекулярной стабильности.

В CG-MALS взаимодействия между белковыми молекулами в растворе характеризовались изменениями в их поведении светорассеяния при различных концентрациях. С помощью этой серии измерений светорассеяния рассчитывали второй вириальный коэффициент A_2 , который является характерным параметром для измерения взаимодействий молекул. Отрицательный A_2 указывает на притягивающие взаимодействия между молекулами растворенного вещества, тогда как положительный A_2 характерен для отталкивающих взаимодействий между молекулами растворенного белка.

SE-HPLC (эксклюзионная хроматография) является стандартным способом выявления агрегированных и фрагментированных соединений белка.

Капиллярный зонный электрофорез (CZE) представляет собой способ анализа гетерогенности заряда белков в нативном состоянии. CZE выполняли согласно стандартным методам.

RP-HPLC восстановленных образцов представляет собой стандартный метод для выявления окисленных соединений антител.

Концентрацию определяли путем измерения поглощения УФ излучения при 280 нм.

Поглощение неразбавленного образца измеряли при длине волны 350 нм и 510 нм, чтобы идентифицировать усиливающуюся мутность. Мутность образцов также определяли с использованием устройства для измерения мутности в соответствии с Европейской фармакопеей. При визуальном осмотре образцы осматривали визуально при подсветке с обратной стороны.

Оценка условий буфера и pH состава на основе антитела против CLEVER-1

Составы, представленные в таблице 1, выбирали для исследования общего поведения лекарственного вещества FP-1305 в отношении pH, ингредиента буфера и ионной силы в отношении самой высокой коллоидной и термодинамической стабильности белка. Образцы готовили путем диализа FP-1305 (10-15 мг/мл) в указанной буферной системе.

Взаимодействия белок-белок как показатель коллоидной стабильности в буферной системе определяли путем измерения гидродинамического радиуса FP-1305 при повышении концентрации FP-1305. Данные использовали для прогнозирования агрегации белка во время обработки и хранения.

Температуру денатурации (термодинамическую стабильность) в буферной системе определяли путем измерения гидродинамического радиуса FR-1305 при повышении температуры. Как только белковые домены начали денатурировать, гидродинамический радиус белка заметно увеличивался. Температуру начала разворачивания можно рассматривать как индикатор стабильности вторичной структуры белка. Данные использовали для прогнозирования денатурации белка во время обработки и хранения.

pH состава модулировали от 5,5 до 7,4 (приемлемый диапазон для внутривенных или болюсных инъекций). Выбранный L-буфер на основе гистидина охватывает диапазоны pH от нейтральных до слабокислых. Трис-буфер тестировали как альтернативный буферный компонент, охватывающий физиологические области pH. pH регулировали достаточным количеством 6 Н хлористоводородной кислоты и при необходимости 10 Н гидроксидом натрия.

Ионную силу (максимальную ионную силу устанавливали равной изотоничности) составов с Трис-буфером модулировали путем добавления хлорида натрия.

Таблица 1. Выбранные составы и результаты nanoDSC и DLS

№ варианта	pH	Буфер	Соль	T _{onset} [°C]	kd [мл/мг*10 ⁻²]
1	5,5	10 mM L-гистидина/HCl	150 mM NaCl	49	-0,4
2	5,5	10 mM L-гистидина/HCl	без	55	0,8
3	6,0	10 mM гистидина/HCl	без	58	0,4
4	6,5	10 mM L-гистидина/HCl	150 mM NaCl	52	-0,6
5	6,5	10 mM L-гистидина/HCl	без	55	-0,2
6	7,4	10 mM Трис/HCl	150 mM NaCl	61	-0,5
7	7,4	10 mM Трис/HCl	без	59	-1,7

Из результатов, представленных в таблице 1, видно, что коллоидная стабильность FR-1305 выше при кислых значениях pH по сравнению с нейтральными значениями pH. Однако высокая ионная сила значительно снижает отталкивающие взаимодействия при низком pH и должна быть исключена. Явные отталкивающие белковые взаимодействия наблюдали для буферов на основе гистидина/HCl без хлорида натрия при pH 5,5 и 6,0. При pH 7,4 добавление хлорида натрия уменьшало взаимодействия притяжения и, таким образом, благотворно влияло на коллоидную стабильность.

Термодинамическая стабильность в некоторой степени противоположна коллоидной стабильности. Добавление хлорида натрия способствует термодинамической стабильности системы на основе Трис-буфера. В случае L-гистидина/HCl добавление

хлорида натрия снижает начальную температуру разворачивания. Следовательно, состав с буфером на основе гистидина предпочтительно не содержит хлорида натрия (NaCl).

На основании результатов этих тестов отбирали варианты представленных в таблице 2 составов и тестировали с использованием CG-MALS, nanoDSC, DLS и SE-HPLC с добавлением стабилизаторов трегалозы, маннита и L-пролина при концентрациях, приводящих к изотоничности. Вариант № 6 оценивали как альтернативный вариант при физиологическом pH. Результаты представлены в Таблице 3.

Таблица 2. Варианты состава

№ варианта	pH	Буфер	Стабилизатор
2-1	5,5	10 mM L-гистидина/HCl	280 mM трегалозы
2-2	5,5	10 mM L-гистидина/HCl	280 mM маннита
2-3	5,5	10 mM L-гистидина/HCl	280 mM пролина
3-1	6,0	10 mM L-гистидина/HCl	280 mM трегалозы
3-2	6,0	10 mM L-гистидина/HCl	280 mM маннита
3-3	6,0	10 mM L-гистидина/HCl	280 mM пролина
6	7,4	10 mM Трис/HCl	150 mM NaCl

Таблица 3. Результаты скрининговых экспериментов с CG-MALS, nanoDSC, DLS и SE-HPLC

№ варианта	T _{onset} nanoDSC [°C]	A ₂ ⁺ [10 ⁻⁴ моль*мл*г ⁻²]	kd с помощью DLS [10 ⁻² мл/мг]	T _{onset} DLS [°C]	Относительное содержание агрегатов [%]
2-1	54	0,4	0,0	59	3,6
2-2	54	0,3	-0,1	59	3,7
2-3	54	0,3	0,6	59	3,7
3-1	56	0,3	-0,1	60	3,8
3-2	56	-0,1	-0,2	60	3,8
3-3	56	0,1	0,4	60	3,8
6	60	-0,6	-0,6	62	3,9

Добавление стабилизаторов к буферным системам на основе L-гистидина/HCl не оказывало заметного влияния как на коллоидную, так и на термодинамическую стабильность. Взаимодействия между молекулами были почти нулевыми (от слегка отталкивающих до слегка притягивающих) во всех случаях.

Провокационный тест на концентрацию

Широкий диапазон pH (pH демонстрирует самый сильный эффект в отношении коллоидной и термодинамической стабильности) использовали без добавления дополнительных стабилизаторов в провокационном тесте на концентрацию. Тестируемые варианты подробно представлены в таблице 1.

Концентрацию лекарственного вещества FP-1305 повышали до 16 мг/мл с использованием устройства с поперечным потоком. Раствор FP-1305 центрифугировали при 4000 оборотов в минуту в течение 5 минут для удаления любых нерастворимых частиц. После этого раствор фильтровали с использованием мембранного фильтра 0,22 мкм. Образцы для тестирования стабильности при ускоренном разложении готовили путем диализа концентрированного лекарственного вещества (DS) FP-1305 в выбранных вариантах буфера в три стадии диализа для достижения количественной замены буфера. 50 мл DS с концентрацией приблизительно 16 мг/мл переносили в предварительно кондиционированные (в диализном буфере) диализные пробирки. Заполненные диализные пробирки инкубировали в 1000 мл целевого буфера в течение 2 часов перед первой заменой буфера (1000 мл). После диализа в течение еще двух часов буфер заменяли второй раз (1000 мл) для завершения диализа на протяжении ночи.

После этого раствор концентрировали до приблизительно 100 мг/мл путем ультрафильтрации. После стадии концентрирования растворы стерильно фильтровали с использованием шприцевого фильтра 0,22 мкм в условиях ламинарного потока. 0,5 мл высококонцентрированных образцов помещали в стерилизованные стандартные стеклянные флаконы 2R. Образцы хранили при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ($2-8^\circ\text{C}$) и 35°C в течение 7 дней. Образцы анализировали с помощью УФ-излучения при 280 нм и проводили измерения поглощения при 350 нм и 510 нм, а также SE-HPLC до и после хранения. Образцы также анализировали визуально.

Результаты определения концентрации с использованием УФ-излучения при 280 нм представлены на фиг. 2. Во всех вариантах состава могут быть реализованы концентрации FP-1305 выше 100 мг/мл. При исследовании краткосрочной стабильности высококонцентрированных образцов концентрация оставалась неизменной.

Результаты измерения адсорбции при 350 нм и 510 нм показаны на фигуре 3. Ни один из составов не показал усиления мутности при исследовании стабильности ни при $5 \pm 3^\circ\text{C}$, ни при 35°C . При визуальном осмотре в начале исследования стабильности все составы демонстрировали прозрачный раствор слегка красного цвета. После 7 дней хранения как при $5 \pm 3^\circ\text{C}$, так и при 35°C ни в одном из образцов не было обнаружено видимых частиц.

Образование растворимых агрегатов выявляли с помощью SE-HPLC, как описано выше в аналитических способах, во всех вариантах состава как при $5 \pm 3^\circ\text{C}$, так и при 35°C , как показано на фигуре 4. При 35°C агрегаты образовывались быстрее, чем при $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Образование агрегатов было ниже в составах с L-гистидином/HCl по сравнению с составом с Трис/HCl. Не наблюдали заметного эффекта pH составов с L-гистидином в отношении образования агрегатов с тенденцией к меньшему образованию агрегатов при более кислом pH, т. е. при pH 5,5 и pH 6,0.

Исследование форсированного разложения

На основании упомянутого выше исследования стабильности составы, представленные в таблице 4, выбирали для дальнейшего тестирования в исследовании форсированного разложения с целью определения вариантов составов, демонстрирующих наибольшую стабильность в условиях стресса вследствие воздействия нескольких факторов (стресса вследствие воздействия светового излучения, стресса вследствие воздействия нагревания с перемешиванием и стресса вследствие воздействия замораживания/размораживания). Составы готовили с полисорбатом 20 (PS20) или без него. Проводили дополнительные исследования в условиях стресса вследствие воздействия светового излучения с вариантами 3-1 + PS20, 3-2 + PS20 и 3-3 + PS20 с добавлением 20 мМ L-метионина в состав для изучения стабилизирующего эффекта L-метионина в отношении индуцированного радикалами химического разложения.

Таблица 4. Составы, выбранные после провокационного теста на концентрацию для дальнейшего тестирования

№ варианта	pH	Буфер	Стабилизатор	Полисорбат 20
3-1	6,0	10 мМ L-гистидина/HCl	280 мМ трегалозы	без
3-1 + PS20	6,0	10 мМ L-гистидина/HCl	280 мМ трегалозы	0,02%
3-2	6,0	10 мМ L-гистидина/HCl	280 мМ маннита	без
3-2 + PS20	6,0	10 мМ L-гистидина/HCl	280 мМ маннита	0,02%
3-3	6,0	10 мМ L-гистидина/HCl	280 мМ пролина	без
3-3 + PS20	6,0	10 мМ L-гистидина/HCl	280 мМ пролина	0,02%
6	7,4	10 мМ Трис/HCl	150 мМ NaCl	без
6 + PS20	7,4	10 мМ Трис/HCl	150 мМ NaCl	0,02%

Концентрацию лекарственного вещества FP-1305 повышали до 25 мг/мл с использованием устройства с поперечным потоком. Раствор FP-1305 центрифугировали при 4000 оборотов в минуту в течение 5 минут для удаления любых нерастворимых

частиц. После этого раствор фильтровали с использованием мембранного фильтра 0,22 мкм. Образцы для тестирования стабильности при ускоренном разложении готовили путем диализа концентрированного лекарственного вещества FP-1305 в выбранных вариантах буфера в три стадии диализа для достижения количественной замены буфера. Диализ FP-1305 проводили в три стадии диализа для достижения количественной замены буфера. 25 мл раствора с приблизительно 25 мг/мл FP-1305 переносили в предварительно кондиционированные (в диализном буфере) диализные пробирки. Заполненные диализные пробирки инкубировали в 1000 мл целевого буфера в течение 2 часов перед первой заменой буфера (1000 мл). После диализа в течение еще двух часов буфер заменяли второй раз (1000 мл) для завершения диализа на протяжении ночи.

После стадии диализа растворы дополняли полисорбатом 20 или полисорбатом 20 и L-метионином для достижения желаемых вариантов состава. После этого образцы стерильно фильтровали с использованием шприцевого фильтра 0,22 мкм в условиях ламинарного потока. 0,8 мл образцов помещали в стерилизованные стандартные стеклянные флаконы 6R. Образцы подвергали следующим стрессовым условиям.

1) Стресс вследствие воздействия форсированного нагревания с перемешиванием: хранение при 35°C с перемешиванием при 200 оборотах в минуту.

2) Воздействие света: в течение 7,5 часа при 750 Вт/м²/25°C.

3) Стресс вследствие воздействия замораживания/размораживания: жидкие образцы замораживали от комнатной температуры до -50°C при контролируемой скорости замораживания и снова нагревали до комнатной температуры при контролируемой скорости нагревания (1°C/минута для моделирования условий объемного замораживания).

До и после каждой временной точки при каждом стрессовом условии два жидких образца каждого варианта визуально анализировали на наличие осадения. Образцы анализировали в отношении концентрации с помощью УФ излучения при 280 нм, мутности с помощью измерения поглощения при 350 нм и 510 нм, агрегатного состояния с помощью SE-HPLC, химического разложения с помощью CZE и RP-HPLC восстановленных образцов. Результаты представлены в таблицах 5-9.

На фигуре 5 показаны результаты определения концентрации с помощью УФ излучения при 280 нм.

Концентрация образцов оставалась постоянной во всех вариантах. К образцам также добавляли раствор L-метионина (варианты 3-1 + PS20 + метионин, 3-2 + PS20 + метионин и 3-3 + PS20 + метионин), что приводило к разбавлению. Целевые концентрации этих образцов составляли приблизительно 24 мг/мл. Концентрацию измеряли с помощью УФ излучения при 280 нм.

Результаты измерения адсорбции при 350 нм и 510 нм представлены на фигуре 6. Стресс вследствие воздействия замораживания/размораживания не показал усиления мутности образцов. Поглощение при 350 нм немного усиливалось после стресса вследствие воздействия светового излучения. Наблюдали некоторый положительный эффект полисорбата 20. Метионин не оказывает благоприятного эффекта в отношении мутности после стресса вследствие воздействия светового излучения. Через 2 недели при стрессе вследствие воздействия нагревания некоторые составы помутнели (варианты 3-2 и 3-3).

Визуально прозрачные образцы получали во всех вариантах состава с полисорбатом после тестирования после стресса вследствие воздействия замораживания/размораживания и после стресса вследствие воздействия светового излучения. Стресс вследствие воздействия нагревания вызывал образование гелеобразных частиц. После 2 недель стресса вследствие воздействия нагревания все варианты с полисорбатом 20 оставались прозрачными, тогда как все варианты без полисорбата 20 содержали гелеобразные частицы.

Возможную агрегацию тестировали с помощью SE-HPLC. На фигуре 7 показано содержание агрегатов в вариантах состава в начале исследования стабильности и после каждого стресс-теста (столбики слева направо соответствуют вариантам, указанным сверху вниз на фигуре 7).

После стресса вследствие воздействия замораживания/размораживания усиление агрегации наблюдали для вариантов 3-2 и 3-2 + PS20, содержащих маннит. Небольшое усиление агрегации наблюдали для вариантов 6 и 6 + PS20, содержащих Трис-буфер. В других вариантах дополнительные агрегаты не образовывались.

Стресс вследствие воздействия светового излучения вызывал агрегацию во всех вариантах состава, при этом самая низкая агрегация наблюдалась в варианте 3-3, за которым следовали варианты 3-1, 3-2 и 6. Наблюдали некоторый незначительный положительный эффект полисорбата 20 и L-метионина. Агрегаты увеличивались во всех составах при стрессе вследствие воздействия нагревания/перемешивания, при этом самая сильная агрегация наблюдалась в варианте 6. Через 2 недели при 35°C содержание агрегатов повышалось во всех вариантах состава.

Капиллярный зональный электрофорез (CZE) использовали для контроля гетерогенности заряда антитела, что служило мерой химической стабильности образца. На фигуре 8 показана гетерогенность заряда вариантов состава в начале исследования стабильности и после каждого стресс-теста (столбики слева направо соответствуют вариантам, указанным сверху вниз на фигуре 8). После стресса формировались кислые

подварианты, являющиеся потенциально дезамидированными подвариантами, и другие гетерогенности заряда. Стресс вследствие воздействия замораживания/размораживания оказывал лишь незначительный эффект в отношении гетерогенности заряда образцов. Наибольшее разложение наблюдали после стресса вследствие воздействия светового излучения. Разложение было выше для варианта № 6 по сравнению с другими вариантами. Полисорбат 20 и метионин не оказывали заметного эффекта в отношении химической стабильности FP-1305. Образование вариантов заряда наблюдали для всех вариантов состава при стрессе вследствие воздействия нагревания. Наивысшую стабильность наблюдали во всех вариантах, содержащих буфер на основе гистидина/HCl. Наименьшую стабильность наблюдали для варианта № 6 (буфер на основе Трис/HCl). Полисорбат 20 не показывал ни положительного, ни отрицательного влияния на стабильность FP-1305 в отношении химического разложения.

Образцы анализировали также с помощью RP-HPLC восстановленных образцов для выявления окисленных продуктов разложения. На фигуре 9 показана чистота с помощью RP-HPLC восстановленных образцов вариантов состава в начале исследования стабильности и после каждого стресс-теста (столбики слева направо соответствуют вариантам, указанным сверху вниз на фигуре 9). Никакого разложения/окисления не наблюдали после стресса вследствие воздействия замораживания/размораживания и нагревания в течение до 2 недель при 35°C с перемешиванием. При стрессе вследствие воздействия светового излучения чистота образцов снижалась, при этом наибольшую чистоту наблюдали в варианте 3-1, за которым следовали варианты 3-2, 3-3 и 6. Полисорбат 20 не оказывал влияния на чистоту FP-1305 при RP-HPLC восстановленных образцов. L-метионин показывал незначительный положительный эффект в отношении чистоты FP-1305 после стресса вследствие воздействия светового излучения.

В заключение следует отметить, что буферная система на основе гистидина/HCl при pH 6,0 была предпочтительнее буферной системы на основе Трис/HCl из-за более высокой химической стабильности и меньшей тенденции к агрегации. Однако буферная система на основе Трис/HCl, по-видимому, представляет собой альтернативу буферной системе на основе гистидина/HCl, хотя стабильность FP-1305 лучше в слабокислой буферной системе на основе гистидина. Доказали, что добавление полисорбата 20 повышает стабильность, особенно при стрессе вследствие воздействия замораживания/размораживания, поскольку образцы без полисорбата 20 показывали мутность после тестирования на замораживание/размораживание. Стабилизаторы трегалоза и пролин были предпочтительнее маннита с буфером на основе гистидина из-за более высокой стабильности при стрессе вследствие воздействия

замораживания/размораживания. Добавление метионина показывало небольшой стабилизирующий эффект на FP-1305 в отношении разложения, вызванного радикалами (образование агрегатов и примесей во время стресса вследствие воздействия светового излучения).

Исследования стабильности при ускоренном разложении

Два состава, представленные в таблице 5, подвергали исследованиям стабильности при ускоренном разложении для изучения стабильности FP-1305 при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 25°C и 35°C .

Таблица 5. Составы для тестирования стабильности при ускоренном разложении

№ варианта	pH	Буфер	Стабилизатор	Антиоксидант	Поверхностно-активное вещество
3-1 + PS20	6,0	10 mM L-гистидина/ HCl	280 mM трегалозы	20 mM L-метионина	0,02% полисорбата 20
3-3 + PS20	6,0	10 mM L-гистидина/ HCl	280 mM пролина	20 mM L-метионина	0,02% полисорбата 20

Концентрацию лекарственного вещества FP-1305 повышали до 25 мг/мл с использованием устройства с поперечным потоком. Образцы для тестирования стабильности при ускоренном разложении готовили путем диализа концентрированного лекарственного вещества FP-1305 в выбранных вариантах буфера в три стадии диализа для достижения количественной замены буфера подобно описанному выше в отношении исследования форсированного разложения. После стадии диализа растворы дополняли исходным раствором полисорбата 20 и раствором L-метионина для получения желаемых вариантов состава. После этого образцы стерильно фильтровали с использованием шприцевого фильтра 0,22 мкм в условиях ламинарного потока. 1,4 мл образцов помещали в стерилизованные стандартные стеклянные флаконы 6R.

Образцы хранили при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ($2-8^{\circ}\text{C}$), $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в перевернутом виде без контроля влажности в течение 12 недель. Брали по два образца жидкости для каждой временной точки (T0, T4 недели, T8 недель, T12 недель) и температуры. Все образцы анализировали в каждой временной точке отдельно в отношении концентрации с помощью УФ излучения при 280 нм, мутности с помощью нефелометрического измерения, агрегатного состояния с помощью SE-HPLC и химического разложения с помощью RP-HPLC восстановленных образцов и CZE. Результаты показаны на фигурах 10-16.

На фигуре 10 показаны результаты определения концентрации с помощью УФ излучения при 280 нм. Концентрация образцов оставалась постоянной во время тестирования стабильности, независимо от температуры хранения и состава. Также образцы всех вариантов состава при визуальном осмотре оставались прозрачными во время исследования стабильности независимо от температуры хранения.

На фигуре 11 показаны результаты нефелометрического измерения мутности. Мутность образцов оставалась постоянной во время тестирования стабильности при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ и 25°C . При 35°C наблюдали небольшое усиление мутности обоих вариантов состава. Вариант состава 3-1 + PS20 был немного менее мутным, чем вариант состава 3-3 + PS20. Усиленная мутность является признаком образования нерастворимых агрегатов. Однако мутность образцов была относительно низкой даже после 12 недель при 35°C . Через 12 недель наблюдали небольшое снижение мутности при 25°C и 35°C , что могло быть вызвано увеличением размера частиц возможно осажденных агрегатов.

На фигурах 12-14 показано содержание мономеров, агрегатов и фрагментов в вариантах состава во время исследования стабильности. Анализы SE-HPLC показали, что при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ и при 25°C относительное содержание мономеров оставалось почти постоянным. Небольшое уменьшение относительной площади пика мономеров наблюдали для обоих вариантов состава при 35°C . Содержание агрегатов оставалось постоянным при температуре хранения $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Напротив, содержание агрегатов снижалось во время исследования стабильности при 25°C и 35°C . Скорее всего, это было вызвано выпадением образовавшихся агрегатов при 25°C и 35°C , что соответствовало повышенной мутности образцов. Содержание фрагментов увеличивалось при 25°C и 35°C , тогда как оно оставалось почти постоянным при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в обоих составах.

Капиллярный зональный электрофорез (CZE) использовали для контроля гетерогенности заряда антитела, что служило мерой химической стабильности образца. На фигуре 15 показана гетерогенность заряда вариантов состава во время исследования стабильности. Гетерогенность заряда образцов оставалась почти постоянной в течение первых 4 недель тестирования стабильности независимо от температуры хранения. Через 8 недель площадь основного пика уменьшилась при всех трех температурах хранения для обоих вариантов состава. Более сильное разложение наблюдали при повышенных температурах. Через 12 недель площадь основного пика обоих составов оставалась неизменной при температуре хранения $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ и 25°C .

На фигуре 16 показана чистота по данным RP-HPLC восстановленных образцов для вариантов состава 3-1 + PS20 и 3-3 + PS20 во время исследования стабильности. Пунктирные линии на фигуре показывают минимальную и максимальную чистоту

эталона FP-1305, измеренную во время исследования стабильности (в каждой временной точке эталон FP-1305 анализировали в начале и в конце каждой последовательности). С помощью RP-HPLC восстановленных образцов выявляли в основном окисленные продукты разложения антител. В анализах с помощью RP-HPLC оба варианта состава 3-1 + PS20 и 3-3 + PS20 показывали небольшое увеличение продуктов разложения (окисленных форм) во время тестирования стабильности при 25°C и 35°C. Оба варианта состава показывали сопоставимое химическое разложение. Выявили, что химическое разложение является наиболее критическим путем разложения лекарственного вещества FP-1305.

На основании результатов можно заключить, что оба состава 3-1 + PS20 и 3-3 + PS20 обеспечивают стабильный состав для антитела против CLEVER-1. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения pH раствор состава доводили до 6,0 и буферизировали L-гистидином. pH можно было доводить с помощью достаточного количества (q. s.) 6 Н хлористоводородной кислоты и, при необходимости, 10 Н гидроксидом натрия. L-метионин добавляется для улучшения стабильности и действует как антиоксидант. Дигидрат трегалозы или пролин также добавляется в состав для улучшения стабильности, действуя как стабилизатор. Неионогенный полисорбат 20 используют в качестве поверхностно-активного вещества для дополнительной стабилизации молекулы в жидком составе. Состав 3-1 + PS20 был немного менее мутным, чем состав 3-3 + PS20. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения состав содержит трегалозу, такую как дигидрат трегалозы, в качестве стабилизатора. Составы являются стабильными по меньшей мере при 2-8°C (5°C $\pm$ 3°C).

Тест стабильности (18 месяцев при 5°C $\pm$ 3°C)

Состав 3-1 + PS20 (концентрация лекарственного вещества FP-1305 составляла 25 мг/мл) хранили в стеклянных флаконах DIN 10R гидролитического класса I в течение 18 месяцев при 5°C $\pm$ 3°C. Выбирали пробку из бромбутилкаучука с покрытием FlugoTec для сведения к минимуму взаимодействий между лекарственным продуктом и укупорочным средством и для сохранения целостности укупорочного средства контейнера.

После 18 месяцев хранения при 5°C $\pm$ 3°C не отмечали значительного изменения pH, осмоляльности, невидимых невооруженным глазом частиц (НІАС), концентрации (УФ), идентичности (изображение капиллярного изоэлектрического фокусирования (icIEF)) или чистоты (SE-HPLC). Что касается внешнего вида раствора, образец оставался

прозрачным (сравнимым с водой), в отличие от предыдущих временных точек (слегка опалесцирующий раствор). Результаты показаны на фигуре 18.

Исследование эффективности

Состав 3-1 + PS20 (концентрация лекарственного вещества FP-1305 составляла 25 мг/мл) хранили при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ и после 18-месячного хранения выполняли анализ биологической активности для измерения эффективности антитела против CLEVER-1. Биологическую функцию определяли с использованием клеточного анализа. Концентрация антител, необходимая для достижения полумаксимальной эффективности, называется EC_{50} . Эффективность тестируемого образца оценивали путем сравнения кривых тестируемых образцов с эталонным материалом по соотношению EC_{50} . Эффективность выражали в процентах относительно эффективности эталонного материала (FP-1305, хранившегося при -70°C). Состав в соответствии с данным изобретением проявлял биологическую активность в течение длительных периодов времени, в том числе по меньшей мере до приблизительно восемнадцати месяцев. Результат анализа биологической активности представлен на фигуре 17. Относительная эффективность после периода хранения составляла 92,3%.

Клиническое исследование

Антитело против CLEVER-1 FP-1305 в настоящее время тестируется на безопасность и предварительную эффективность в рамках исследования фазы I/II у пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях (clinicaltrials.gov NCT03733990: Исследование по оценке безопасности, переносимости и предварительной эффективности FP-1305 у больных раком пациентов (MATINS)). Накопленная информация о безопасности указывает на хорошую переносимость FP-1305. Это очень положительный показатель характеристик продукта, поскольку традиционные цитотоксические противораковые средства лечения были ассоциированы с зависимой от дозы и ограничивающей лечение токсичностью. Переносимость и уровень нежелательных побочных эффектов, наблюдаемых у человека, также соответствуют доклиническим наблюдениям ингибирования функции CLEVER-1 у грызунов и у обезьян. Первые касающиеся людей данные также свидетельствуют о хорошей клинической эффективности: у 8 из 30 получавших лечение пациентов с метастатическими опухолями на очень поздних стадиях не наблюдали прогрессирования целевых поражений, а 3 пациентов при последующем наблюдении демонстрировали явное уменьшение опухоли (фиг. 19). На фигуре 19 показаны изображения сканов компьютерной томографии на

исходном уровне и при последующем наблюдении метастатических поражений у пациентов с лучшими ответами. Стрелки указывают на уменьшение метастазов в легких у пациентов с микросателлитно-стабильным (MSS) метастатическим колоректальным раком (CRC), меланомой и раком яичника. Размер целевых поражений и изменение во времени представлены в правой части каждой фигуры.

В исследовании фазы I/II также наблюдали, что у пациентов, получавших антитело против CLEVER-1 FP-1305, происходило повышение уровней LDL в плазме (P-LDL), как показано в таблице 6, что указывает на то, что связывание и поглощение LDL ингибируется или блокируется моноцитами/макрофагами с CLEVER-1. Антитело против CLEVER-1 FP-1305 предотвращает поглощение холестерина LDL макрофагами и образование пенистых клеток, поскольку acLDL не расщепляется. Это рассматривают как увеличение уровней LDL у больных раком пациентов, получавших лечение с помощью FP-1305.

Первый (до введения дозы) образец плазмы натощак брали до начала применения FP-1305. Второй образец плазмы натощак (после введения дозы) брали в конце первого 3-недельного цикла лечения антителом против CLEVER-1 FP-1305. Результаты представлены в таблице 6, уровни LDL в плазме (P-LDL) выражены в ммоль/л.

Таблица 6

	P-LDL (ммоль/л)	
	До введения дозы	После введения дозы
Пациент 1	2,7	3,4
Пациент 2	1,9	2,5
Пациент 3	3,3	3,5
Пациент 4	3,8	4,8
Пациент 5	2,7	3,0

Формула изобретения

1. Стабильный фармацевтический состав, который содержит

- 1-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),

- 5-50 мМ буфера на основе гистидина в комбинации с 150 мМ - 400 мМ трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства, при этом рН указанного фармацевтического состава находится в диапазоне 5,5-6,5, или

- 5-50 мМ Трис-буфера в комбинации с 100-200 мМ хлорида натрия в качестве стабилизирующего средства, при этом рН указанного фармацевтического состава находится в диапазоне 7,0-7,6, и

- 0,01-0,1% (масс./об.) полисорбата в качестве неионного поверхностно-активного вещества,

при этом антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) содержит(содержат) следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 1),

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 2) и

CDR 3: HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 3), а также

следующие последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 4),

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 5) и

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 6).

2. Состав по п. 1, отличающийся тем, что антитело против CLEVER-1 или его антигенсвязывающий(ие) фрагмент(ы) содержит(содержат) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 тяжелой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 легкой цепи.

3. Состав по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что антитело против CLEVER-1 представляет собой бексмарилимаб, описанный в WHO Drug Information, том 34, № 3 (2020), или вариант бексмарилимаба, или антитело в биоаналоге бексмарилимаба.

4. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что антитело против CLEVER-1 представляет собой антитело FP-1305 (DSM ACC3361).

5. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав содержит буфер на основе гистидина и характеризуется pH от 5,5 до 6,2 и предпочтительно от 5,8 до 6,2.

6. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что буфер на основе гистидина содержит L-гистидин.

7. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав содержит 5-20 mM или 5-15 mM буфера на основе гистидина.

8. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав содержит 200-360 mM, предпочтительно 240-320 mM или 270-290 mM трегалозы, пролина или маннита в качестве стабилизирующего средства.

9. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав содержит трегалозу или пролин, предпочтительно трегалозу, в качестве стабилизирующего средства.

10. Состав по любому из предшествующих пунктов 1-4, отличающийся тем, что состав содержит 5-20 mM или 5-15 mM Трис-буфера.

11. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав содержит полисорбат 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества.

12. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав содержит 0,01-0,05% (масс./об.) полисорбата, предпочтительно полисорбата 20.

13. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит антиоксидант, предпочтительно антиоксидант содержит L-метионин.

14. Состав по п. 13, отличающийся тем, что композиция содержит 5-40 мМ, предпочтительно 15-25 мМ L-метионина.

15. Состав по п. 11, отличающийся тем, что состав содержит 10-100 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов), предпочтительно 20-40 мг/мл и более предпочтительно 20-30 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов).

16. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав содержит:

(i) 1 мг/мл - 100 мг/мл, предпочтительно 20-40 мг/мл и более предпочтительно 20-30 мг/мл антитела против CLEVER-1 или его антигенсвязывающего(их) фрагмента(ов),

(ii) 5-50 мМ, предпочтительно 5-20 мМ или 5-15 мМ буфера на основе гистидина,

(iii) 150-400 мМ, предпочтительно 200-360 мМ и более предпочтительно 240-320 мМ или 260-290 мМ трегалозы, пролина или маннита, предпочтительно трегалозы или пролина и более предпочтительно трегалозы, в качестве стабилизирующего средства,

(iv) 0,01-0,1% (масс./об.), предпочтительно 0,01-0,05% (масс./об.) полисорбата, предпочтительно полисорбата 20 в качестве неионного поверхностно-активного вещества, и

(v) 5-40 мМ, предпочтительно 15-25 мМ L-метионина в качестве антиоксиданта, при этом рН указанной композиции составляет от 5,5 до 6,5, предпочтительно от 5,8 до 6,2.

17. Состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что состав представляет собой жидкий состав или находится в лиофилизированной форме.

18. Состав по любому из предшествующих пунктов для применения в качестве лекарственного препарата.

19. Состав по любому из предшествующих пунктов для применения в лечении рака, хронических инфекций, острых воспалительных инфекций, гиперхолестеринемии, дислипидемии или атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания.

20. Состав по п. 19, отличающийся тем, что состав вводится внутривенно.

21. Состав по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что состав вводится в дозе 0,1 мг/кг – 50 мг/кг, предпочтительно 0,1 мг/кг – 30 мг/кг или 0,1-10 мг/кг, рассчитанной по антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

Тяжелая цепь

```

QVTLKESGPT LVKPTQTLTL TCSFSGFSLT TSGMGIGWIR QPPGKALEWL 50
AHIWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARH 100
YGYDPYYAMD YWGQGTLLTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL 150
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFFAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT 200
KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGGP SVFLFPPKPK 250
DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS 300
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV 350
YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 400
DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK 449

```

Легкая цепь

```

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCTASSSVS SSYLHWYQQK PGKAPKLLIY 50
RTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTLTISSLQ PEDFATYYCH QYHRSPPTFG 100
QGKLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF YPREAKVQWK 150
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ 200
GLSSPVTKSF NRGEK 215

```

Фиг. 1

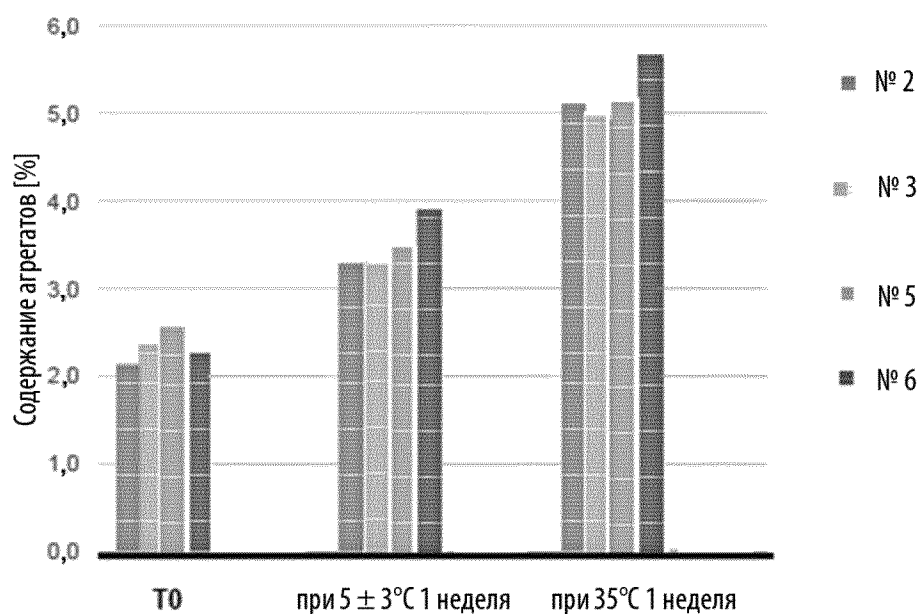
	Концентрация, измеренная с помощью УФ излучения при 280 нм (мг/мл)							
	№ 2		№ 3		№ 5		№ 6	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Т0	108	109	105	96	104	105	117	117
1 неделя при 5 ± 3°C	108	109	103	100	104	103	119	122
1 неделя при 35°C	112	112	102	102	103	105	125	125

Фиг. 2

	Мутность, измеренная с помощью поглощения при 350 нм							
	№ 2		№ 3		№ 5		№ 6	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Т0	0,46	0,44	0,49	0,50	0,64	0,64	0,63	0,64
1 неделя при 5 ± 3°C	0,43	0,44	0,46	0,46	0,60	0,60	0,59	0,59
1 неделя при 35°C	0,46	0,46	0,48	0,49	0,63	0,64	0,62	0,62

	Мутность, измеренная с помощью поглощения при 510 нм							
	№ 2		№ 3		№ 5		№ 6	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Т0	0,09	0,07	0,09	0,10	0,13	0,13	0,15	0,15
1 неделя при 5 ± 3°C	0,07	0,07	0,07	0,07	0,10	0,10	0,10	0,10
1 неделя при 35°C	0,07	0,07	0,06	0,08	0,10	0,10	0,11	0,11

Фиг. 3



Фиг. 4

	Концентрация, измеренная с помощью УФ излучения при 280 нм (мг/мл)															
	№ 6		№ 6 + PS20		№ 3-1		№ 3-1 + PS20		№ 3-2		№ 3-2 + PS20		№ 3-3		№ 3-3 + PS20	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
T0	28	29	30	28	27	26	26	27	25	26	26	26	27	28	26	27
Замораживание/размораживание	28	30	29	30	26	27	25	25	26	25	26	26	27	26	26	27
Стресс вследствие воздействия светового излучения	29	29	28	29	28	25	26	24	25	25	26	28	29	27	28	27
1 неделя при 35°C + встряхивание	30	30	30	30	26	27	27	27	26	29	28	28	27	29	28	27
2 недели при 35°C + встряхивание	29	30	29	30	26	26	26	26	25	26	25	28	25	26	28	27

	Концентрация, измеренная с помощью УФ излучения при 280 нм (мг/мл)					
	№ 3-1 + PS20 + метионин		№ 3-2 + PS20 + метионин		№ 3-3 + PS20 + метионин	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Стресс вследствие воздействия светового излучения	24	25	25	25	26	26

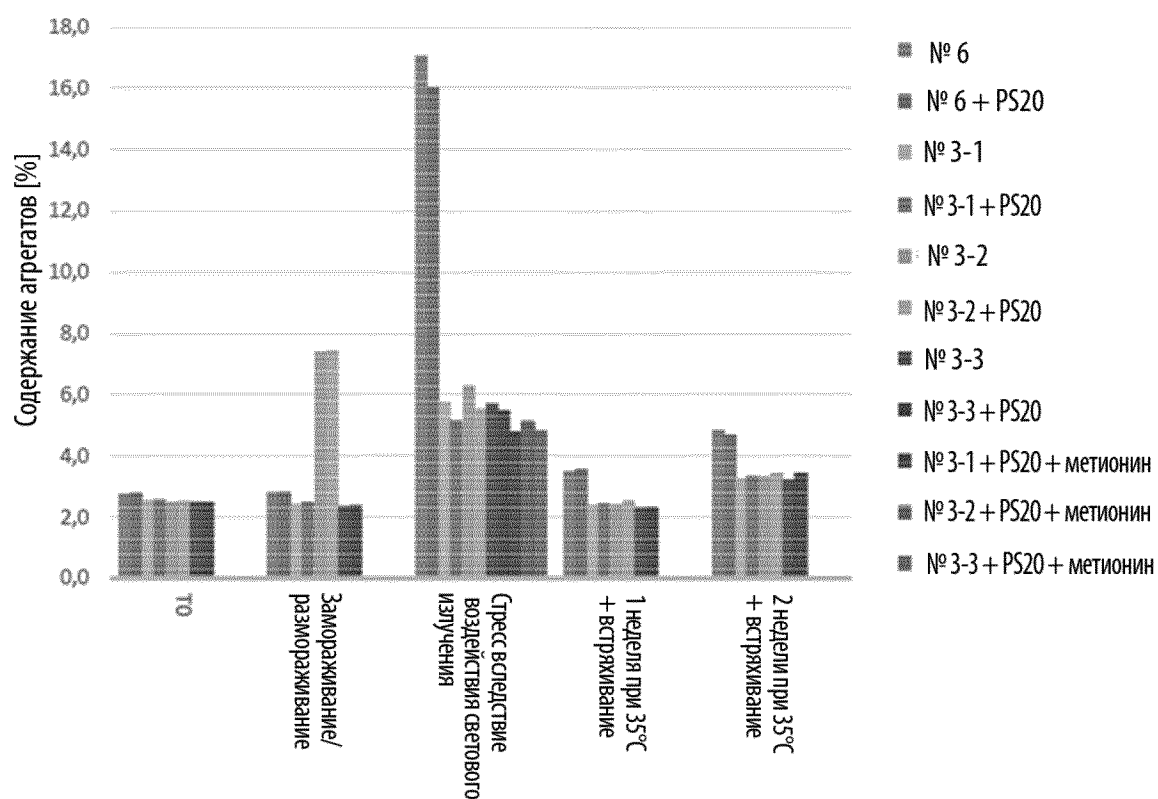
Фиг. 5

	Мутность, измеренная с помощью поглощения при 350 нм (Au)															
	№ 6		№ 6 + PS20		№ 3-1		№ 3-1 + PS20		№ 3-2		№ 3-2 + PS20		№ 3-3		№ 3-3 + PS20	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
T0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,13	0,13	0,13	0,12	0,13	0,12	0,13	0,11	0,14	0,15	0,14	0,13
Замораживание/размораживание	0,15	0,16	0,15	0,16	0,16	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,13	0,13	0,14	0,15	0,14	0,14
Стресс вследствие воздействия светового излучения	0,22	0,22	0,22	0,22	0,32	0,25	0,22	0,23	0,33	0,30	0,25	0,27	0,46	0,42	0,43	0,45
1 неделя при 35°C + встряхивание	0,17	0,16	0,17	0,17	0,14	0,14	0,13	0,13	0,14	0,16	0,13	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15
2 недели при 35°C + встряхивание	0,18	0,18	0,16	0,17	0,15	0,14	0,14	0,14	0,21	0,15	0,13	0,15	0,61	0,16	0,16	0,18

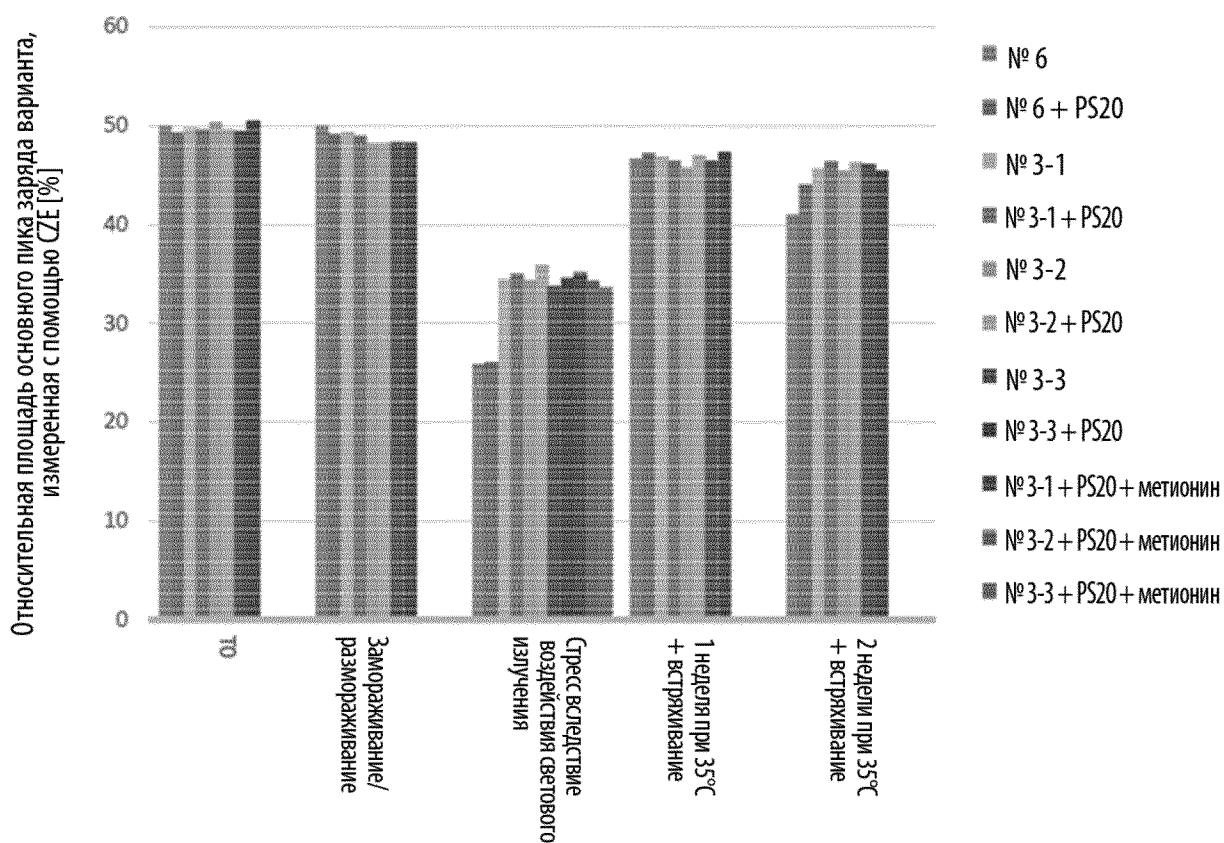
	Мутность, измеренная с помощью поглощения при 510 нм (Au)															
	№ 6		№ 6 + PS20		№ 3-1		№ 3-1 + PS20		№ 3-2		№ 3-2 + PS20		№ 3-3		№ 3-3 + PS20	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
T0	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01
Замораживание/размораживание	0,02	0,03	0,01	0,03	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02
Стресс вследствие воздействия светового излучения	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,01	0,04	0,04
1 неделя при 35°C + встряхивание	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
2 недели при 35°C + встряхивание	0,04	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,06	0,04	0,02	0,03	0,27	0,04	0,03	0,03

	Мутность, измеренная с помощью поглощения при 350 нм (Au)					
	№ 3-1 + PS20 + метионин		№ 3-2 + PS20 + метионин		№ 3-3 + PS20 + метионин	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Стресс вследствие воздействия светового излучения	0,24	0,22	0,26	0,25	0,42	0,38

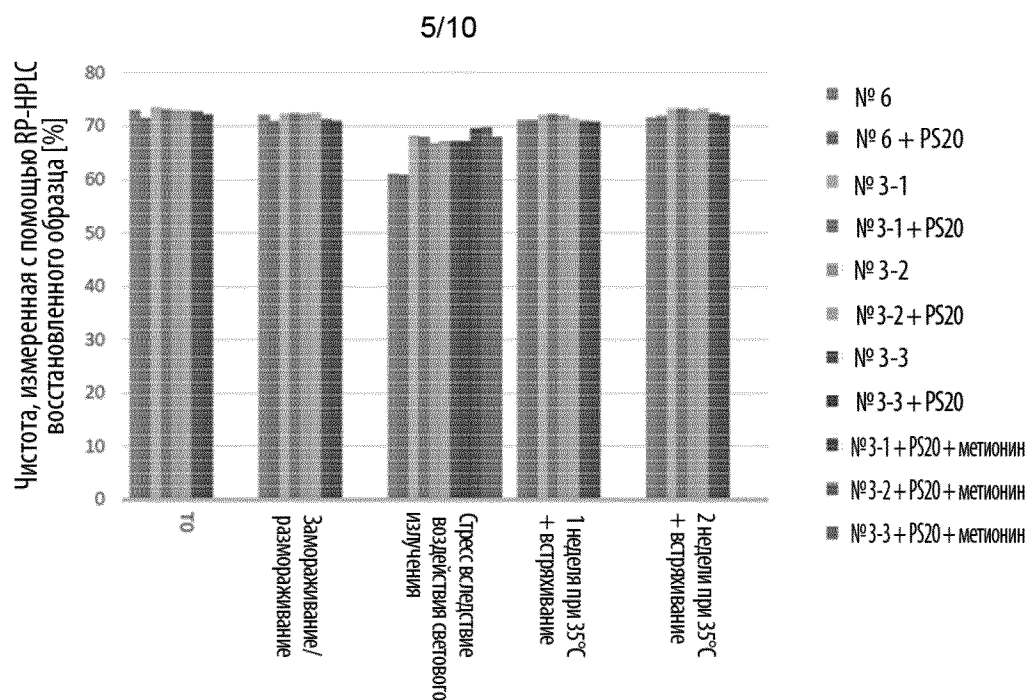
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



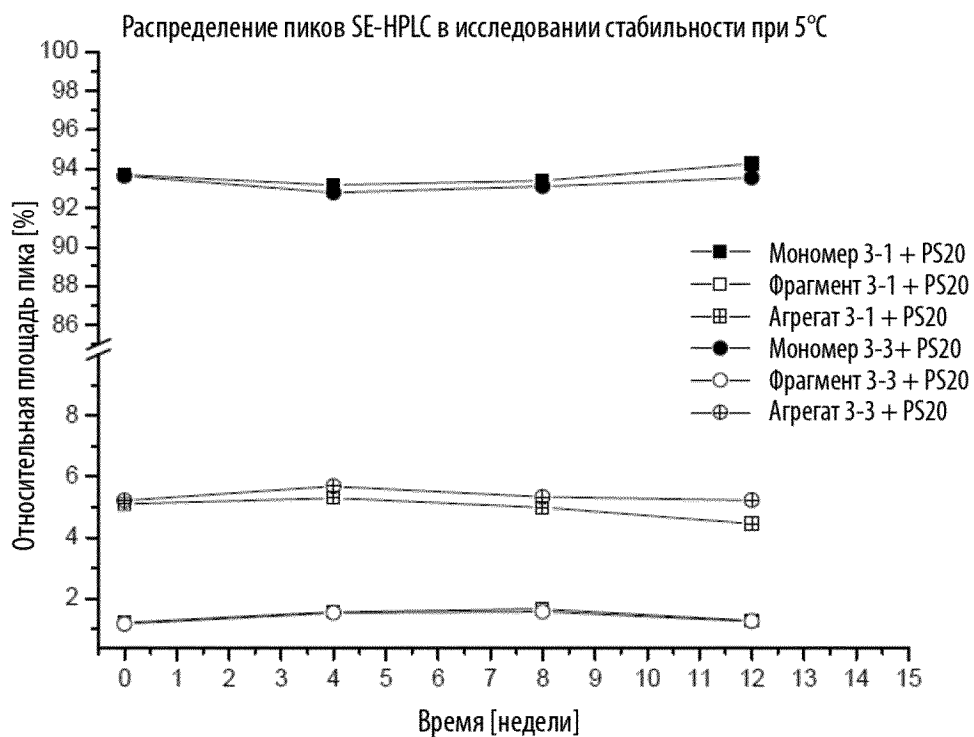
Фиг. 9

	Концентрация, измеренная с помощью УФ излучения при 280 нм (мг/мл)							
	т0		4 недели		8 недель		12 недель	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
№ 3-1 + PS20 при 5°C	24	25	24	25	28	25	26	27
№ 3-3 + PS20 при 5°C	25	25	24	25	25	25	27	27
№ 3-1 + PS20 при 25°C	24	25	24	25	25	27	27	27
№ 3-3 + PS20 при 25°C	25	25	24	24	25	26	27	28
№ 3-1 + PS20 при 35°C	24	25	24	25	25	25	27	27
№ 3-3 + PS20 при 35°C	25	25	25	23	27	25	28	27

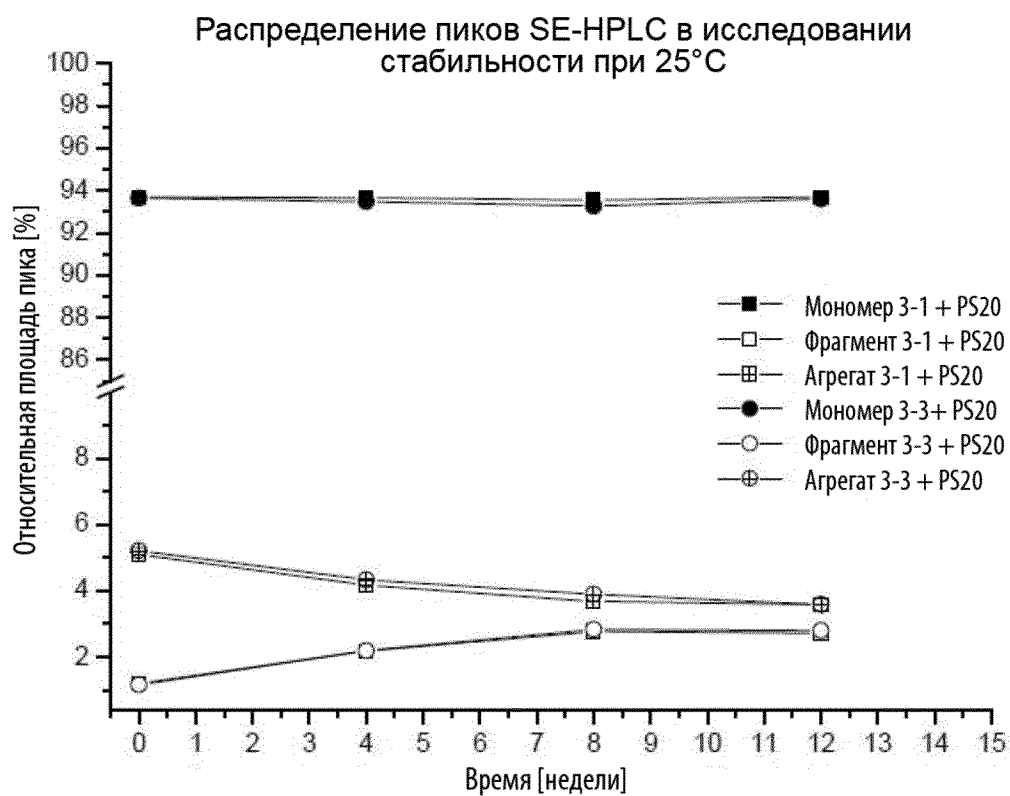
Фиг. 10

	Мутность, измеренная с помощью нефелометрии (NTU)							
	т0		4 недели		8 недель		12 недель	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
№ 3-1 + PS20 при 5°C	9,5	9,1	9,8	9,7	10,5	9,7	9,5	9,4
№ 3-3 + PS20 при 5°C	11,5	11,7	11,7	12,1	12,0	11,5	11,8	12,2
№ 3-1 + PS20 при 25°C	9,5	9,1	10,4	10,4	12,6	11,2	10,6	10,8
№ 3-3 + PS20 при 25°C	11,5	11,7	13,0	12,1	13,3	12,4	11,5	11,7
№ 3-1 + PS20 при 35°C	9,5	9,1	12,4	12,6	11,9	13,0	11,9	10,8
№ 3-3 + PS20 при 35°C	11,5	11,7	12,7	12,4	15,3	15,2	13,1	13,8

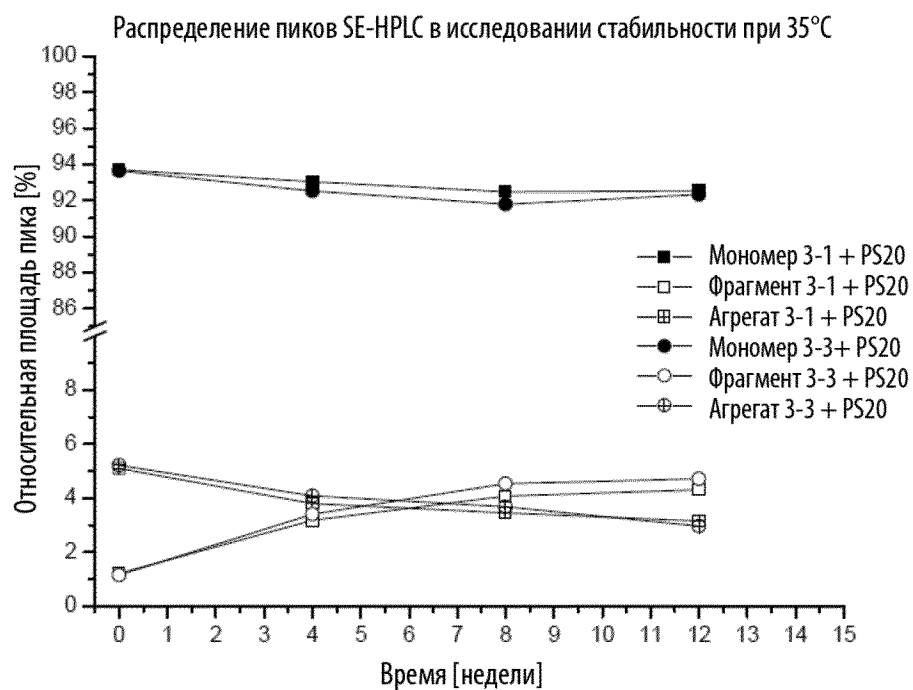
Фиг. 11



Фиг. 12



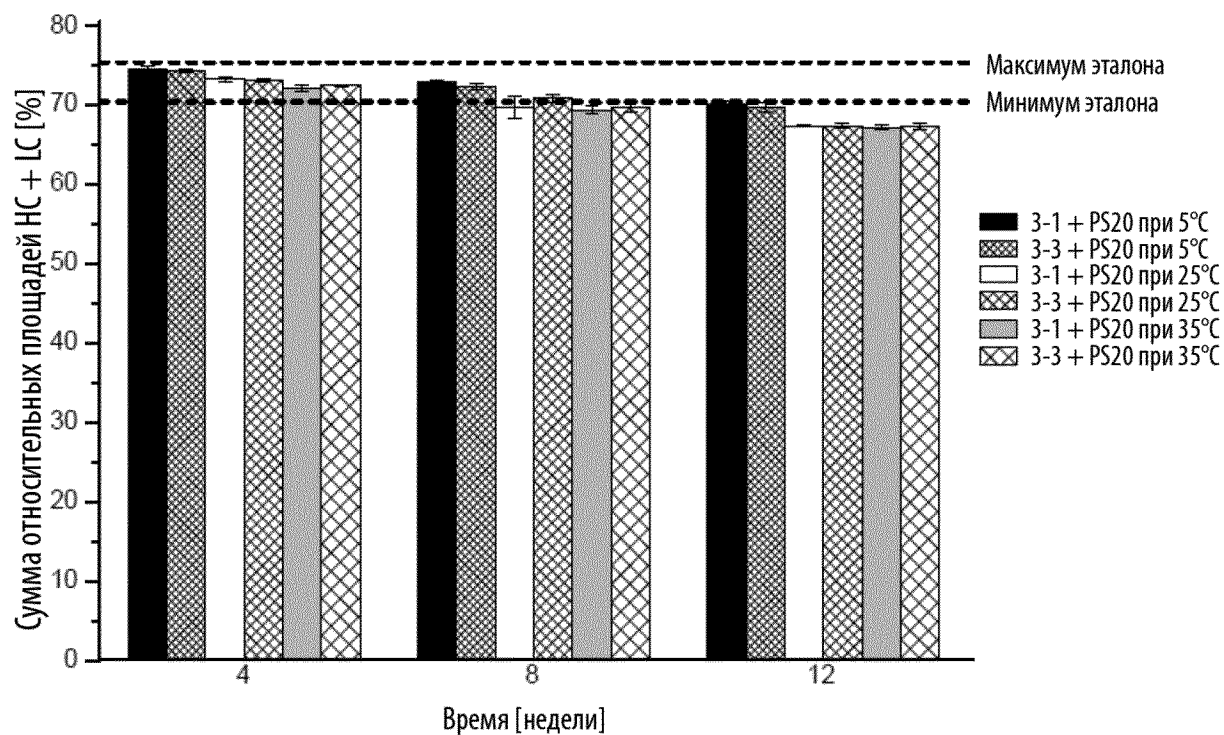
Фиг. 13



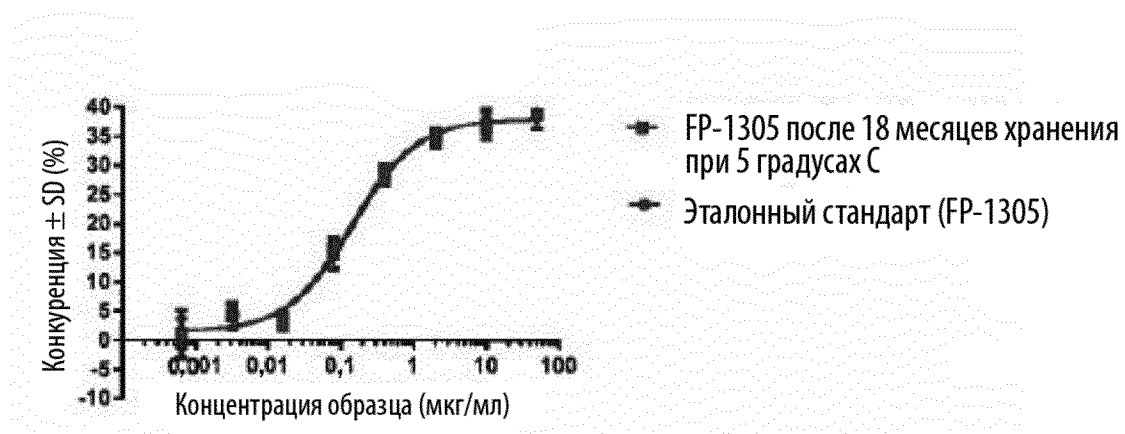
Фиг. 14

	Относительная площадь пика, измеренная с помощью CZE [%]							
	то		4 недели		8 недель		12 недель	
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
№ 3-1 + PS20 при 5°C	40,5	39,7	39,7	39,4	38,0	37,3	38,9	39,2
№ 3-3 + PS20 при 5°C	40,8	40,9	39,9	39,3	37,1	37,8	38,1	38,4
№ 3-1 + PS20 при 25°C	40,5	39,7	38,8	38,6	36,6	36,6	37,5	36,9
№ 3-3 + PS20 при 25°C	40,8	40,9	39,7	39,2	36,1	36,6	38,0	37,0
№ 3-1 + PS20 при 35°C	40,5	39,7	38,2	38,7	35,8	34,8	24,1	24,2
№ 3-3 + PS20 при 35°C	40,8	40,9	39,2	38,7	36,2	36,3	26,3	25,5

Фиг. 15



Фиг. 16



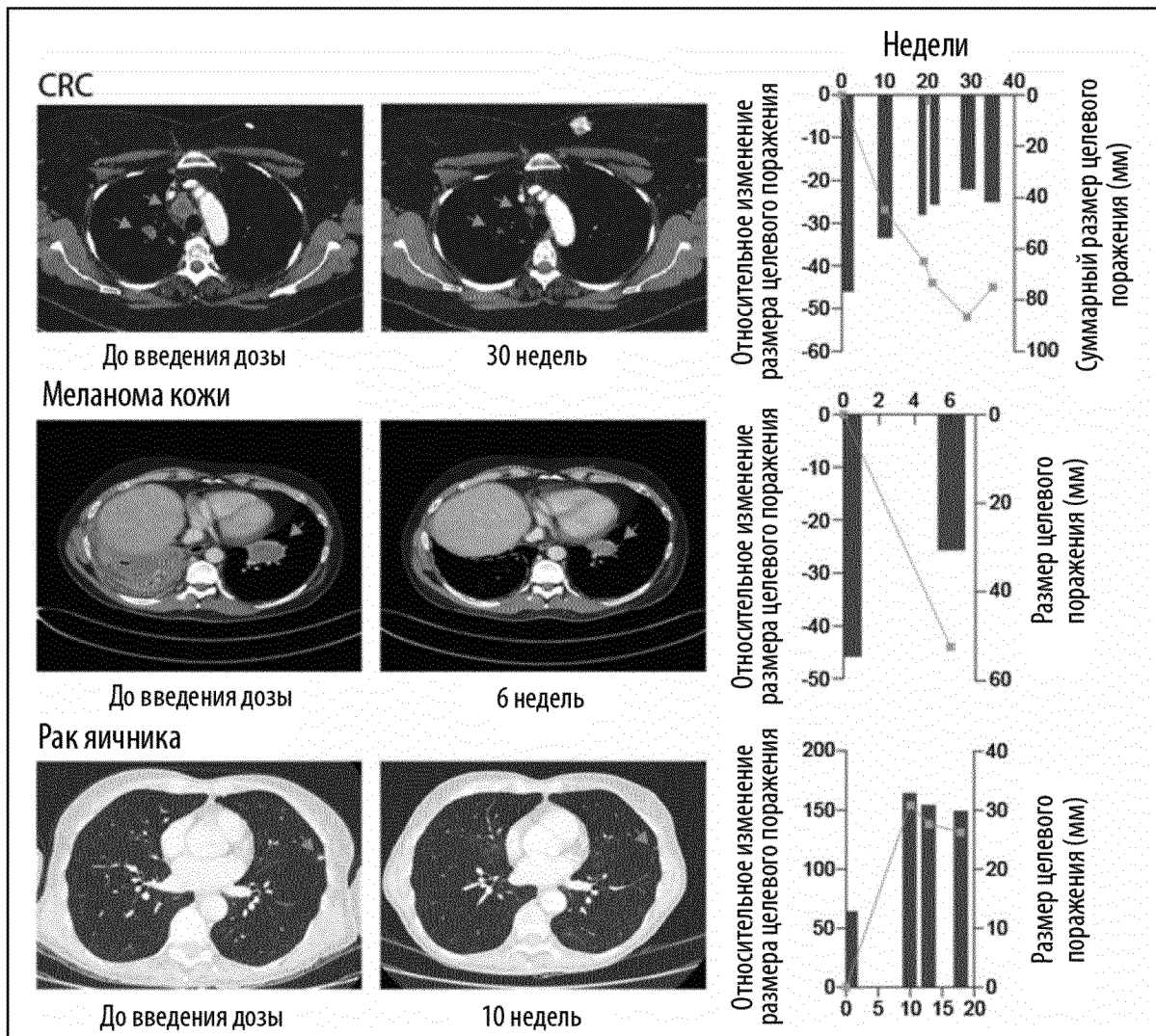
Фиг. 17

Условие хранения			5°C ± 3°C, в вертикальном положении						
			Интервал теста стабильности						
Аналитический параметр	Приемлемые критерии	Аналитический способ	Начало	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев
Внешний вид раствора	Цвет: от бесцветного до слегка розового	Ph. Eur., USP	Бесцветный раствор	Бесцветный раствор *)	Бесцветный раствор *)	Бесцветный раствор *)	Бесцветный раствор *)	Бесцветный раствор *)	Бесцветный раствор *)
	Опалесценция: от прозрачного до слегка опалесцирующего (≤ эталонной суспензии III)		Слегка опалесцирующий **)	Слегка опалесцирующий **)	Слегка опалесцирующий **)	Слегка опалесцирующий **)	Слегка опалесцирующий **)	Слегка опалесцирующий **)	Прозрачный раствор
	Присутствие частиц: раствор практически не содержит видимых частиц		практически не содержит видимых частиц	практически не содержит видимых частиц	практически не содержит видимых частиц	практически не содержит видимых частиц	практически не содержит видимых частиц	практически не содержит видимых частиц	практически не содержит видимых частиц
pH	6,0 ± 0,2	Ph. Eur., USP	6,1	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,2
Осмоляльность	310 - 410 мосмоль/кг	Ph. Eur., USP	365 мосмоль/кг	359 мосмоль/кг	359 мосмоль/кг	361 мосмоль/кг	360 мосмоль/кг	360 мосмоль/кг	360 мосмоль/кг
Невидимые невооруженным глазом частицы (НВАС)	Ø ≥ 10 мкм: ≤6000/флакон, Ø ≥ 25 мкм: ≤600/флакон	Ph. Eur., USP	Ø ≥ 10 мкм: 48/флакон, Ø ≥ 25 мкм: 2/флакон	Ø ≥ 10 мкм: 142/флакон, Ø ≥ 25 мкм: 2/флакон	Ø ≥ 10 мкм: 23/флакон, Ø ≥ 25 мкм: 1/флакон	Ø ≥ 10 мкм: 2/флакон, Ø ≥ 25 мкм: 0/флакон	Ø ≥ 10 мкм: 8/флакон, Ø ≥ 25 мкм: 3/флакон	Ø ≥ 10 мкм: 10/флакон, Ø ≥ 25 мкм: 5/флакон	Ø ≥ 10 мкм: 6/флакон, Ø ≥ 25 мкм: 0/флакон
Концентрация	22,5 - 27,5 мг/мл	УФ-спектрофотометрия	26,3 мг/мл	25,3 мг/мл	26,0 мг/мл	25,5 мг/мл	25,2 мг/мл	26,1 мг/мл	26,0 мг/мл
Чистота	Целевой мономер ≥90%, Сумма агрегатов и фрагментов ≤10%	SE-HPLC	Мономер : 99%, Сумма агрегатов и фрагментов :1%	Мономер : 99%, Сумма агрегатов и фрагментов :1%	Мономер : 99%, Сумма агрегатов и фрагментов :1%	Мономер : 99%, Сумма агрегатов и фрагментов :1%	Мономер : 99%, Сумма агрегатов и фрагментов :1%	Мономер : 99%, Сумма агрегатов и фрагментов :1%	Мономер : 99%, Сумма агрегатов и фрагментов :1%
Чистота	Изоформа 1: рI 7,5 ±0,3, площадь ≥ 4,0%	cIEF электрофорез	pI: 7,52, A%: 6,802	pI: 7,51, A%: 6,482	pI: 7,54, A%: 7,425	pI: 7,53, A%: 6,956	pI: 7,52, A%: 7,454	pI: 7,53, A%: 7,507	pI: 7,55, A%: 7,765
	Изоформа 2: рI 7,7 ±0,3, площадь ≥ 40%		pI: 7,71 A%: 55,542	pI: 7,70, A%: 55,762	pI: 7,75, A%: 54,578	pI: 7,73, A%: 56,015	pI: 7,72, A%: 55,261	pI: 7,73, A%: 55,350	pI: 7,75, A%: 55,064
	Изоформа 3: рI 7,9 ±0,3, площадь ≥ 15,0%		pI: 7,96, A%: 27,181	pI: 7,95, A%: 27,210	pI: 7,99, A%: 27,637	pI: 7,97, A%: 26,844	pI: 7,96, A%: 27,041	pI: 7,96, A%: 26,891	pI: 7,97, A%: 26,790
	Изоформа 4: рI 8,1 ±0,3, площадь ≥ 4,0%		pI: 8,21, A%: 10,476	pI: 8,20, A%: 10,547	pI: 8,25, A%: 10,360	pI: 8,23, A%: 10,186	pI: 8,21, A%: 10,244	pI: 8,21, A%: 10,253	pI: 8,23, A%: 10,381
	Любой неучтенный пик: площадь ≤ 10 %								

*) сравнимый с водой

**) сравнимый с эталонной суспензией II

Фиг. 18



Фиг. 19