

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390075 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.09

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.18

(54) СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К А-АКТИВИНУ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/040,589

(32) 2020.06.18

(33) US

(86) PCT/US2021/038016

(87) WO 2021/257947 2021.12.23

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Камен Дуглас, Грэхам Кеннет (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к новым фармацевтическим составам, содержащим антитело, которое специфически связывается с А-активинном человека. Составы могут содержать, помимо антитела к А-активину, гистидиновый буфер, органический сорастворитель и термостабилизатор. Фармацевтические составы по данному изобретению характеризуются удивительной степенью стабильности антитела после хранения в течение нескольких месяцев и после воздействия термического и другого физического стресса.

A1

202390075

202390075

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576879EA/019

СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К А-АКТИВИНУ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/040,589, поданной 18 июня 2020 года, содержание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к области составов на основе терапевтических антител. Конкретнее, данное изобретение относится к области фармацевтических составов, содержащих антитело, которое специфически связывается с А-активинном человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия (FOP), также известная как болезнь Мюнхеймера, представляет собой аутосомно-доминантное нарушение, характеризующееся ранним началом, эпизодической и прогрессирующей оссификацией скелетных мышц и связанной с ними соединительной ткани. У субъектов с FOP происходит формирование костей в мягких тканях за пределами нормального скелета, процесс, известный как гетеротопическая оссификация (HO), который может приводить к развитию вторичного скелета и постепенно ограничивает способность пациента к движению. Было показано, что удаление новых костных образований является неэффективным и приводит к дополнительному росту новой кости.

FOP обусловлена мутациями внутриклеточного домена ACVR1 (ALK2), при этом подавляющее большинство из них приводит к изменению аргинина 206 на гистидин (R206H) (Pignolo, R.J. *et al.* 2011, *Orphanet J. Rare Dis.* 6:80). ACVR1 является рецептором I типа костных морфогенетических белков (BMP). Предполагается, что мутация R206H, среди прочих, обуславливает повышение чувствительности рецептора к активации и делает его более устойчивым к сайленсингу.

Хотя для облегчения ассоциированных с FOP боли и отека при обострениях использовались определенные типы лекарственных средств, в настоящее время эффективного терапевтического лечения FOP не существует. Антитела к А-активину являются одним из примеров терапевтически релевантной макромолекулы, для которой требуется соответствующий состав. Несмотря на то, что некоторые из антител к А-активину известны, в данной области техники все еще остается потребность в новых фармацевтических составах, содержащих антитела к А-активину, которые являются достаточно стабильными и подходят для введения пациентам.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способы получения антител, пригодных в качестве терапевтических средств для медицинского применения, включают получение химерных антител и гуманизированных антител (см., например, U.S. 6949245). См., например, WO 94/02602 (Abgenix) и U.S.

6596541 (Regeneron Pharmaceuticals), публикации которых прямо включены в данный документ посредством ссылки, в которых описаны способы получения трансгенных мышей, у которых вырабатываются антитела человека. В заявке на выдачу патента США № 9718881 описаны антитела к А-активину человека, и она включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Терапевтические антитела должны быть составлены таким способом, чтобы антитела были не только подходящими для введения пациентам, но также способом, который обеспечивает сохранение их стабильности при хранении и последующем применении. Например, терапевтические антитела в жидком растворе, при ненадлежащем составлении, склонны к фрагментации, выпадению в осадок, агрегации и подвержены нежелательным химическим модификациям. Стабильность антитела в жидком составе зависит не только от используемых в составе типов вспомогательных веществ, но также от количеств и пропорций вспомогательных веществ по отношению друг к другу. Кроме того, при приготовлении жидкого состава на основе антитела помимо стабильности должны учитываться и другие аспекты. Примеры таких дополнительных аспектов включают вязкость раствора и концентрацию антитела, которые могут быть скорректированы для данного состава, а также визуальное качество или внешний вид состава. Таким образом, при составлении терапевтического антитела, необходимо проявлять большую осторожность, чтобы получить состав, который остается стабильным, содержит адекватную концентрацию антитела и обладает подходящей вязкостью, а также другими свойствами, которые обеспечивают удобство введения состава пациентам.

Данное изобретение удовлетворяет вышеупомянутую потребность путем обеспечения фармацевтических составов, содержащих антитело человека, которое специфически связывается с А-активинном человека.

В одном аспекте предложен жидкий фармацевтический состав, содержащий: (i) антитело, которое специфически связывается с А-активинном; (ii) буфер; (iii) органический соразтворитель; и (iv) термостабилизаторы.

В другом аспекте данное изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему: (i) антитело к А-активину человека или его антигенсвязывающую часть; (ii) буфер с уровнем pH $6,3 \pm 0,3$; (iii) органический соразтворитель; и (iv) один или несколько термостабилизаторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающая часть содержат следующие шесть последовательностей CDR: (a) HCDR1, имеющая последовательность GGSFSSH (SEQ ID NO.: 1); (b) HCDR2, имеющая последовательность ILYTG (SEQ ID NO.: 2); (c) HCDR3, имеющая последовательность ARARSGITFTGIIVPGSFDI (SEQ ID NO.: 3); (d) LCDR1, имеющая последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO.: 4); (e) LCDR2, имеющая последовательность GAS (SEQ ID NO.: 5); и (f) LCDR3, имеющая последовательность QQYGSSPWT (SEQ ID NO.: 6).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело имеет молекулярную массу около 145235,3 Да.

В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация антитела или его антигенсвязывающей части составляет $60 \text{ мг/мл} \pm 6 \text{ мг/мл}$.

В некоторых вариантах реализации изобретения буфер представляет собой гистидиновый буфер. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация гистидина составляет $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$.

В некоторых вариантах реализации изобретения органический соразтворитель представляет собой полисорбат 20. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полисорбата 20 составляет $0,05\% \text{ мас./об.} \pm 0,025\%$.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или несколько термостабилизаторов включают сахарозу и аргинин. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация сахарозы составляет $5\% \pm 1\% (\text{мас./об.})$ и концентрация аргинина составляет $70 \text{ mM} \pm 14 \text{ mM}$.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтический состав содержит $60 \text{ мг/мл} \pm 6 \text{ мг/мл}$ антитела, $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ гистидина, уровень pH $6,3 \pm 0,3$, $0,05\% \text{ мас./об.} \pm 0,025\%$ полисорбата 20, $5\% \text{ мас./об.} \pm 1\%$ сахарозы и $70 \text{ mM} \pm 14 \text{ mM}$ аргинина.

В некоторых вариантах реализации изобретения спустя 56 суток хранения при 40°C и 75% относительной влажности (RH) по меньшей мере 90% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 30% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

В некоторых вариантах реализации изобретения спустя 56 суток хранения при 40°C и 75% RH по меньшей мере 93% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 34,5% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

В некоторых вариантах реализации изобретения спустя 56 суток хранения при 40°C и 75% RH по меньшей мере 97% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 45% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

В некоторых вариантах реализации изобретения спустя шесть месяцев хранения при 25°C и 60% RH по меньшей мере 90% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 40% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

В некоторых вариантах реализации изобретения спустя шесть месяцев хранения при 25°C и 60% RH по меньшей мере 95% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 45% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

В некоторых вариантах реализации изобретения спустя шесть месяцев хранения при 25°C и 60% RH по меньшей мере 98% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 50% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

В некоторых вариантах реализации изобретения спустя 24 месяцев хранения при 2-8 °C по меньшей мере 98% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 55% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 95% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

В другом аспекте данное изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему (a) 60 мг/мл $\pm$ 10 мг/мл антитела к А-активину человека или его антигенсвязывающей части (b) 10 мМ $\pm$ 2 мМ гистидина, уровень pH 6,3 $\pm$ 0,3, (c) 0,05% $\pm$ 0,025% полисорбата 20, (d) 70 мМ $\pm$ 14 мМ аргинина и (e) 5% $\pm$ 1% сахарозы, причем антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO:7, содержащую ее или состоящую из нее, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO:8, содержащую ее или состоящую из нее. В одном варианте реализации изобретения тяжелая цепь содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO:9, содержащую ее или состоящую из нее. В одном варианте реализации изобретения тяжелая цепь содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO:10, содержащую ее или состоящую из нее.

В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержится в контейнере. В некоторых вариантах реализации изобретения контейнер представляет собой флакон. В некоторых вариантах реализации изобретения флакон является стеклянным. В некоторых вариантах реализации изобретения стекло представляет собой боросиликатное стекло 1 типа с бутылкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FlugoTec®.

В некоторых вариантах реализации изобретения состав является подходящим для внутривенного введения нуждающемуся в этом субъекту-человеку. В некоторых вариантах реализации изобретения состав является подходящим для подкожного введения нуждающемуся в этом субъекту-человеку.

В некоторых вариантах реализации изобретения состав представляет собой жидкий состав. В некоторых вариантах реализации изобретения состав представляет собой лиофилизированный состав.

В другом аспекте данное изобретение относится к набору, содержащему описанный в данном документе фармацевтический состав, контейнер и инструкции по его применению.

В некоторых вариантах реализации изобретения контейнер представляет собой стеклянный флакон с хлорбутилкаучуковой пробкой с покрытием FluroTec®.

В другом аспекте данное изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью А-активина, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества одной или нескольких из описанных в данном документе фармацевтических композиций нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание или нарушение, ассоциированное с активностью А-активина, представляет собой прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию.

Другие варианты реализации изобретения будут очевидны из обзора нижеследующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1** показаны аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи (SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10 соответственно) иллюстративного моноклонального антитела к А-активину.

На **Фиг. 2** показан эффект варьирования состава в отношении скорости деградации антитела к А-активину в случае инкубации его при 40°C/75%RH в течение 2 месяцев. Что касается уровней размера частиц, измеренных с помощью НІАС и MFI, показанные результаты представляют собой конечные уровни размера частиц спустя 2 месяца инкубации (граничные значения USP<788> указаны для результатов НІАС). Состав 15 представляет собой контрольный состав, в котором все факторы являются номинальными. Линия представляет собой линию сравнения, обозначающую скорость изменения ответа для контрольного состава.

На **Фиг. 3** показан эффект варьирования состава в отношении скорости деградации антитела к А-активину в случае инкубации его при 25 °C/60%RH в течение 6 месяцев. Что касается уровней размера частиц, измеренных с помощью НІАС и MFI, показанные результаты представляют собой конечные уровни размера частиц спустя 6 месяца инкубации (граничные значения USP<788> указаны для результатов НІАС). Состав 15 представляет собой контрольный состав, в котором все факторы являются номинальными. Линия представляет собой линию сравнения, обозначающую скорость изменения ответа для контрольного состава.

На **Фиг. 4** показаны эффекты варьирования компонентов состава согласно DOE-дизайну в отношении стабильности антитела к А-активину относительно контрольного состава, обозначенные как «разница относительно контроля» (стрессовые условия в виде 8 циклов замораживания и размораживания, замораживание при -30 °C, размораживание при комнатной температуре; контрольный состав представляет собой F15). Результаты для уровней размера частиц, измеренных с помощью НІАС, показаны как конечные уровни

размера частиц после 8 циклов замораживания и размораживания, и они сравниваются с граничными значениями, указанными в USP<788>.

На **Фиг. 5** показаны эффекты варьирования компонентов состава согласно DoE-дизайну в отношении стабильности антитела к А-активину относительно контрольного состава, обозначенные как «разница относительно контроля» (перемешивание в течение 120 минут путем перемешивания на вортексе; контрольный состав представляет собой F15). Результаты для уровней размера частиц, измеренных с помощью НІАС, показаны как конечные уровни размера частиц спустя 120 минут перемешивания, и они сравниваются с граничными значениями, указанными в USP<788>.

На **Фиг. 6** показаны эффекты варьирования компонентов состава согласно DOE-дизайну в отношении долгосрочной стабильности антитела к А-активину в случае хранения составов при 2-8 °С в течение 12 месяцев (см. таблицу 24 касательно описаний составов). Указанные в USP<788> граничные значения обозначены на графиках, на которых показаны уровни размера частиц, измеренные с помощью НІАС. Результаты показаны в виде зависимости от времени хранения при 2-8 °С.

На **Фиг. 7** показаны эффекты варьирования компонентов состава согласно DOE-дизайну в отношении долгосрочной стабильности антитела к А-активину в случае хранения составов при 2-8 °С в течение 24 месяцев (см. таблицу 24 касательно описаний составов). Указанные в USP<788> граничные значения обозначены на графиках, на которых показаны уровни размера частиц, измеренные с помощью НІАС. Результаты показаны в виде зависимости от времени хранения при 2-8 °С.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перед тем, как будет описано данное изобретение, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и условиями проведения экспериментов, поскольку такие способы и условия могут различаться. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения, и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В контексте данного документа термин «около» при использовании в отношении конкретного указанного числового значения или диапазона значений означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 5%. Например, в контексте данного документа выражение «около 100» включает 95 и 105 и все промежуточные значения (например, 95,00, 95,01, 95,02, 95,03, 95,04, ..., 104,96, 104,97, 104,98, 104,99, 105,00).

Хотя для реализации на практике или тестирования данного изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, предпочтительными являются способы и материалы,

описанные в данном документе. Все упоминаемые в данном документе публикации включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Фармацевтические составы

В контексте данного документа выражение «фармацевтический состав» означает комбинацию по меньшей мере одного активного ингредиента (например, малой молекулы, макромолекулы, соединения и т. д., которые способны проявлять биологический эффект в организме человека или животного, отличного от человека) и по меньшей мере одного неактивного ингредиента, который, при объединении с активным ингредиентом или одним или несколькими дополнительными неактивными ингредиентами, является подходящим для терапевтического введения человеку или животному, отличному от человека. Термин «состав» в контексте данного документа означает «фармацевтический состав», если специально не указано иное. Данное изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим по меньшей мере один терапевтический полипептид. Согласно определенным вариантам реализации данного изобретения терапевтический полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с являющимся белком А-активинном человека. Конкретнее, данное изобретение включает фармацевтические составы, которые содержат: (i) антитело человека, которое специфически связывается с А-активинном человека, (ii) гистидиновый буфер; (iii) органический соразтворитель, который представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество; и (iv) стабилизатор, который представляет собой углевод или неорганическую соль, или комбинацию углевода и неорганической соли. Конкретные иллюстративные компоненты и составы, включенные в данное изобретение, подробно описаны ниже.

Антитела к А-активину

Фармацевтические составы по данному изобретению могут содержать антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с А-активинном человека. В контексте данного документа термин «А-активин» означает А-активин человека, который представляет собой гомо- или гетеродимерный белок. Гомодимерный белок содержит гомодимерную пару субъединиц бета А. Гетеродимерный белок содержит субъединицу бета и субъединицу бета В, бета С или бета Е (т. е. бета А бета В, бета А бета С или бета А бета Е). Каждая из субъединиц экспрессируется в виде полипептидов-предшественников, включающих сигнальный пептид, пропептид и зрелый полипептид. Иллюстративная форма предшественника субъединицы бета А человека представляет собой полипептид длиной 426 аминокислот, называемый в Swiss Prot P08476, из которых остатки 1-20 являются сигнальным пептидом, остатки 21-310 являются пропептидом и остатки 311-426 являются зрелым полипептидом. Иллюстративная форма полипептида-предшественника субъединицы бета В называется в Swiss Prot P09529, причем остатки 1-28 являются сигнальным пептидом, остатки 29-292 являются пропептидом и остатки 293-407 являются зрелым полипептидом. Иллюстративная форма субъединицы бета С называется в Swiss Prot P55103, причем остатки 1-18 являются сигнальным

пептидом, остатки 19-236 являются пропептидом и остатки 237-352 являются зрелым полипептидом. Иллюстративная форма предшественника субъединицы бета Е называется в Swiss Prot P58166, причем остатки 1-19 являются сигнальным пептидом, остатки 20-236 являются пропептидом и остатки 237-350 являются зрелым полипептидом. Несколько вариантов этих последовательностей являются известными, как описано в базе данных Swiss Prot. Ссылка на А-активин включает любое из гомодимера бета А, гетеродимерных форм бета А бета В, бета А бета С и бета А бета Е, а также их субъединицы и их предшественники, в которых субъединицы соединены с пропептидом и/или сигнальным пептидом, определенными иллюстративными последовательностями, представленными в Swiss Prot, или другие встречающиеся в природе формы этих последовательностей человека. Передача сигналов А-активина происходит посредством связывания с ACVR2A или ACVR2B, однако при этом неизвестно, является ли он лигандом ACVR1. А-активин аномально передает сигналы через мутантный ACVR с трансдукцией остеогенных сигналов и запуском гетеротопического формирования кости.

В контексте данного документа подразумевается, что термин «антитело» в общем случае относится к молекулам иммуноглобулинов, содержащим четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимерам (например, IgM); однако молекулы иммуноглобулинов, состоящие только из тяжелых цепей (т. е. не содержащие легких цепей) также охвачены определением термина «антитело». Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (в данном документе сокращено как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (в данном документе сокращено как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). V_H - и V_L -области дополнительно могут быть подразделены на гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Если специально не указано иное, термин «антитело» в контексте данного документа следует понимать как охватывающий полные молекулы антитела, а также его антигенсвязывающие фрагменты. Термин «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «часть антитела» или «фрагмент антитела») в контексте данного документа относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с А-активином человека или его эпитопом.

Подразумевается, что «выделенное антитело» в контексте данного документа относится к антителу, которое практически не содержит других антител с другими типами антигенной специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически

связывается с А-активинном человека, практически не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от А-активина человека), за заметным исключением биспецифических (или полиспецифических) антител, которые специфически связывают, с одной стороны, А-активин, а с другой стороны, другой эпитоп. Более того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала или химических веществ.

Термин «специфически связывает» и т. д. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют с антигеном комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться константой диссоциации по меньшей мере около 1×10^{-6} М или больше. Способы определения того, происходит ли специфическое связывание двух молекул, хорошо известны в данной области техники, и они включают, например, равновесный диализ, метод поверхностного плазмонного резонанса и т. д. Выделенное антитело, которое специфически связывает А-активин человека, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы А-активина других видов (ортологи). В контексте данного изобретения считается, что полиспецифические (например, биспецифические) антитела, которые связываются с А-активинном человека, а также с одним или несколькими дополнительными антигенами, «специфически связывают» А-активин человека.

Иллюстративные антитела к А-активину человека, которые могут быть включены в фармацевтические составы по данному изобретению, изложены в заявке на выдачу патента США № 9718881, описание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Антитела могут также включать антитела, специфически связывающиеся с А-активинном. Такие антитела могут специфически связываться с любой или всеми из форм бета А бета А, бета А бета В, бета А бета С и бета А бета Е А-активина. Некоторые антитела специфически связываются только с одной из этих форм (т. е. бета А бета А, бета А бета В, бета А бета С или бета А бета Е). Специфичность в отношении форм бета А бета В, бета А бета С и бета А бета Е может быть обусловлена эпитопом в пределах субъединицы бета В, бета С или бета Е соответственно или эпитопом, общим для обоих компонентов гетеродимера. Специфичность в отношении бета А бета может быть обусловлена эпитопом, общим для обеих молекул в пределах гомодимера (например, в области контакта субъединиц). Некоторые антитела специфически связываются со всеми из этих форм А-активина, в таком случае эпитоп, как правило, находится на субъединице бета А. Антитела, как правило, содержат эпитопы в пределах компонента белков-предшественников, соответствующего зрелому полипептиду. Некоторые антитела специфически связываются с любой или всеми из форм А-активина без связывания с ингибином человека, который существует в форме гетеродимеров альфа (Swiss Prot P05111) бета А или альфа бета В. Некоторые антитела специфически связываются с любой или всеми из форм А-активина и связываются с любой из или обеими формами ингибина человека. Хотя считается, что такие

антитела ингибируют сигнальную трансдукцию А-активина через один или несколько из его контррецепторов, ACVR2A и/или ACVR2B, и/или BMPR2, понимание механизма не требуется для применения таких антител в способах лечения FOP.

Было описано значительное число антител против А-активина. Например, в US20150037339 описаны антитела человека, обозначаемые H4N10423P, H4N10424P, H4N10426P, H4N10429P, H4N10430P, H4N10432P2, H4N10433P2, H4N10436P2, H4N10437P2, H4N10438P2, H4N10440P2, H4N10442P2, H4N10445P2, H4N10446P2, H4N10447P2, H4N10447P2, H4N10448P2, H4N10452P2.

Предпочтительные антитела характеризуются аффинностью в отношении А-активина (измеряемой при 25 °С, как в Примере 3 заявки на выдачу патента США № 9718881) по меньшей мере 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} или 10^{13} M^{-1} . Некоторые антитела характеризуются аффинностью в пределах диапазона 10^9 - 10^{12} M^{-1} . Предпочтительные антитела ингибируют сигнальную трансдукцию А-активина с IC50 менее 4 нМ и предпочтительно менее 400 пМ или 40 пМ. Некоторые антитела ингибируют сигнальную трансдукцию с IC50 в диапазоне от 4 нМ до 10 пМ или от 3,5 нМ до 35 пМ.

Ингибирование сигнальной трансдукции можно измерять, как в Примере 6 заявки на выдачу патента США № 9718881, который вкратце описан ниже. Линию клеток рабдомиосаркомы A204 человека трансфицировали плазмидой Smad 2/3-репортерный ген люциферазы с получением линии клеток A204/CAGAx12-Luc. Клетки A204/CAGAx12-Luc поддерживали в среде McCoy 5A, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, пенициллином/стрептомицином/глутамином и 250 мкг/мл G418. Для проведения биологического анализа клетки A204/CAGAx12-Luc высевали в 96-луночные планшеты для анализа в концентрации 10000 клеток/луночка в среде с низким содержанием сыворотки, 0,5% FBS и OPTIMEM и инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение ночи. А-активин подвергали серийному разведению 1:3 от 100 до 0,002 нМ и добавляли к клеткам, наличная с контроля, не содержащего активин. Антитела подвергали серийному разведению 1:3, начиная от 100 до 0,002 нМ, от 1000 до 0,02 нМ или от 300 до 0,005 нМ, включая контрольные образцы, содержащие либо соответствующее антитело изотипического контроля, либо не содержащие антитело, и добавляли к клеткам с постоянной концентрацией А-активина 100 пМ.

Некоторые антитела ингибируют связывание А-активина с ACVR2A, и/или ACVR2B, и/или BMPR2 по меньшей мере на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, как измерено в случае, когда рецептор экспрессируется в клетке, или внеклеточный домен слит с Fc-доменом в виде слитого белка, и слитый белок иммобилизован на подложке (например, на сенсорном чипе Biacore). В случае таких измерений антитело и А-активин должны присутствовать в эквимольных количествах, а рецептор или внеклеточный домен - в избытке.

Иллюстративное антитело, используемое в данных примерах, в заявке на выдачу патента США № 9718881 обозначено H4N10446P. В заявке на выдачу патента США № 9718881 его переменная область тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи

имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO:162, 164, 166 и 168 соответственно. В US2015/0037339 его переменная область легкой цепи и CDR легкой цепи, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO:146, 148, 150 и 152 соответственно. H4H10446P ингибирует опосредованную А-активином передачу сигнала через ACVR2A и/или ACVR1IB, но не сильно ингибирует, если вообще ингибирует, связывание А-активина с ACRIIA или ACVR2B. Включены другие антитела, конкурирующие с H4H10446P за связывание с А-активином человека, или связывающиеся с тем же эпитопом на А-активине человека, что и H4H10446P, а также антитела, разделяющие его свойство, заключающееся в ингибировании передачи сигналов.

Другое иллюстративное антитело, используемое в данных способах, в заявке на выдачу патента США № 9718881 обозначено H4H10430P. Его переменная область тяжелой цепи и CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66, 68, 70 и 72 соответственно в заявке на выдачу патента США № 9718881. В заявке на выдачу патента США № 9718881 его переменная область легкой цепи и CDR легкой цепи, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO:74, 76, 78 и 80 соответственно. Это антитело ингибирует связывание А-активина с ACVR2A и/или ACVR2B и ингибирует сигнальную трансдукцию через один или оба из этих рецепторов. Также включены другие антитела, конкурирующие с H4H10430P за связывание с А-активином, или связывающиеся с тем же эпитопом на А-активине, что и H4H10430P, и разделяющие его свойство, заключающееся в ингибировании связывания А-активина с ACVR2A и ACVR2B и сигнальной трансдукции через них.

Иллюстративное антитело, используемое в данных способах, представляет собой гаретосмаб. Рекомбинантное моноклональное антитело гаретосмаб представляет собой ковалентно связанный гетеротетрамер, состоящий из двух связанных дисульфидными связями тяжелых цепей человека (изотип IgG4), каждая из которых посредством дисульфидной связи ковалентно связана с легкой каппа-цепью человека. Исходя из первичной последовательности, антитело без гликанов обладает расчетной молекулярной массой 145235,3 Да, что предполагает образование 16 канонических дисульфидных связей и удаление Lys453 с С-конца каждой тяжелой цепи. Каждая тяжелая цепь предусматривает мутацию с заменой серина на пролин по аминокислоте Pro234 в пределах шарнирной области Fc-домена для снижения предрасположенности антитела изотипа IgG4 образовывать в растворе полуантитела. На каждой тяжелой цепи находится один сайт N-сцепленного гликозилирования (Asn303), расположенный в пределах константной области Fc-домена молекулы. Определяющие комплементарность области (CDR) в пределах переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи гаретосмаба вместе образуют сайт связывания его мишеней: А-активина, активина АВ и активина АС. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи, расположение CDR в пределах каждой полипептидной цепи, расположение сайта N-сцепленного гликозилирования тяжелой цепи и предполагаемые дисульфидные связи моноклонального антитела гаретосмаб представлены на Фигуре 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к А-активину человека предусматривает одну или несколько аминокислотных замен в одной или нескольких каркасных областях по сравнению с канонической вариабельной областью тяжелой цепи, что, как обоснованно ожидается, приведет к изменению распределения заряда на экспонированной поверхности антитела и, следовательно, повлияет на его взаимодействие с окружающим растворителем и вспомогательными веществами.

Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащихся в фармацевтических составах по данному изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных требуемых свойств составов, а также конкретных ситуаций и целей, для которых составы будут использованы. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические составы представляют собой жидкие составы, которые могут содержать от 20 мг/мл $\pm$ 2 мг/мл до 200 мг/мл $\pm$ 20 мг/мл антитела; от 30 $\pm$ 3 мг/мл до 150 $\pm$ 15 мг/мл антитела; от 40 $\pm$ 4 мг/мл до 100 $\pm$ 1 мг/мл антитела; от 45 $\pm$ 4,5 мг/мл до 80 $\pm$ 8 мг/мл антитела; от 50 $\pm$ 5 мг/мл до 60 $\pm$ 6 мг/мл антитела; от 55 $\pm$ 5,5 мг/мл до 60 $\pm$ 6 мг/мл антитела; около 50 мг/мл; 50 мг/мл; 60 мг/мл $\pm$ 6 мг/мл; около 60 мг/мл; 60 мг/мл; около 70 мг/мл; или 70 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с А-активином человека.

Вспомогательные вещества и уровень pH

Фармацевтические составы по данному изобретению содержат одно или несколько вспомогательных веществ. Термин «вспомогательное вещество» в контексте данного документа означает любое нетерапевтическое средство, добавляемое в состав для обеспечения требуемых однородности, вязкости или стабилизирующего эффекта.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтический состав по данному изобретению содержит по меньшей мере один органический сорастворитель такого типа и в таком количестве, чтобы обеспечивалась стабилизация антитела к А-активину человека в стрессовых условиях грубого обращения или перемешивания, таких как, например, перемешивание на вортексе или замораживание и размораживание. В некоторых вариантах реализации изобретения под «стабилизацией» подразумевается сохранение по меньшей мере 95% антитела к А-активину в его нативном состоянии, т. е. не фрагментированного или не агрегированного антитела (в молях) в процессе грубого обращения, такого как перемешивание на вортексе раствора с антителом и органическим сорастворителем в течение около 30 минут, 60 минут или около 120 минут или замораживание и размораживание раствора с антителом и органическим сорастворителем на протяжении 4 циклов или 8 циклов.

В определенных вариантах реализации изобретения органический сорастворитель представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как алкилполи(этиленоксид). Конкретные неионогенные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в составы по данному изобретению, включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полоксамеры, такие как

полоксамер 181, полоксамер 188, полоксамер 407; или полиэтиленгликоль (PEG). Полисорбат 20 также известен как TWEEN 20, сорбитанмонолаурат и полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат. Полоксамер 188 также известен как PLURONIC F68.

Количество неионогенного поверхностно-активного вещества, содержащегося в фармацевтических составах по данному изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных требуемых свойств составов, а также конкретных ситуаций и целей, для которых эти составы предназначены. В определенных вариантах реализации изобретения составы могут содержать от $0,01\% \pm 0,0015\%$ до $1\% \pm 0,15\%$ поверхностно-активного вещества. Например, составы по данному изобретению могут содержать около $0,0085\%$; около $0,01\%$; около $0,02\%$; около $0,03\%$; около $0,04\%$; около $0,05\%$; около $0,06\%$; около $0,07\%$; около $0,08\%$; около $0,09\%$; около $0,1\%$; около $0,11\%$; около $0,12\%$; около $0,13\%$; около $0,14\%$; около $0,15\%$; около $0,16\%$; около $0,17\%$; около $0,18\%$; около $0,19\%$; около $0,20\%$; около $0,21\%$; около $0,22\%$; около $0,23\%$; около $0,24\%$; около $0,25\%$; около $0,3\%$; около $0,4\%$; около $0,5\%$; около $0,6\%$; около $0,7\%$; около $0,8\%$; около $0,9\%$; около 1% ; около $1,1\%$; около $1,15\%$ или около $1,2\%$ полисорбата 20.

Фармацевтические составы по данному изобретению могут также содержать один или несколько стабилизаторов такого типа и в таком количестве, чтобы обеспечивалась стабилизация антитела к А-активину человека в условиях термического стресса. В некоторых вариантах реализации изобретения под «стабилизацией» подразумевается сохранение более чем около 90% антитела в нативной конформации при хранении раствора, содержащего антитело и термостабилизатор, при около $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение вплоть до около 18 месяцев, при около $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение вплоть до около 6 месяцев или при около $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение вплоть до около 56 суток. В некоторых вариантах реализации изобретения под «стабилизацией» подразумевается сохранение более чем около 90% антитела в нативной конформации при хранении раствора, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и термостабилизатор, при около $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение вплоть до около 24 месяцев. В контексте данного документа «нативный» означает основную форму антитела, согласно разделению по размеру, которая обычно представляет собой интактный мономер антитела.

В определенных вариантах реализации изобретения термостабилизатор представляет собой сахар или сахароспирт, выбранный из сахарозы, сорбита, глицерина, трегалозы и маннита или любой их комбинации, количество которых, содержащееся в составе, может варьироваться в зависимости от конкретных ситуаций и предполагаемых целей, для которых используется состав. В определенных вариантах реализации изобретения составы могут содержать от около 5% до около 40% сахара или сахароспирта; от около 1% до около 20% сахара или сахароспирта; от около 5% до около 15% сахара или сахароспирта; от около $7,5\%$ до около $12,5\%$ сахара или сахароспирта; около 10% сахара или сахароспирта; $10\% \pm 1,5\%$ сахара или сахароспирта; или 10% сахара или сахароспирта. Например, фармацевтические составы по данному изобретению могут содержать $1\% \pm 0,2\%$; $2\% \pm 0,4\%$; $3\% \pm 0,6\%$; $4\% \pm 0,8\%$; $5\% \pm 1\%$; $6\% \pm 1,2\%$; $7\% \pm 1,4\%$; $8\% \pm 1,6\%$; $9\% \pm 1,8\%$; $10\% \pm 2\%$;

11%±2,2%; 12%±2,4%; 13%±2,6%; 14%±2,8%; или около 15%±3% (мас./об.) сахара или сахароспирта (например, сахарозы).

В определенных вариантах реализации изобретения термостабилизатор представляет собой аминокислоту (например, аргинин), количество которой, содержащееся в составе, может варьироваться в зависимости от конкретных ситуаций и предполагаемых целей, для которых используется состав. В определенных вариантах реализации изобретения составы могут содержать от около 0 мМ до около 150 мМ аргинина; от около 10 мМ до около 140 мМ аргинина; от около 20 мМ до около 130 мМ аргинина; от около 30 мМ до около 120 мМ аргинина; от около 40 мМ до около 110 мМ аргинина; от около 50 мМ до около 100 мМ аргинина; от около 60 мМ до около 90 мМ аргинина; от около 70 мМ до около 80 мМ аргинина; или около 70 мМ аргинина. Например, фармацевтические составы по данному изобретению могут содержать 0 мМ; 10 мМ±2 мМ аргинина; 20 мМ±4 мМ аргинина; 30 мМ±6 мМ аргинина; 40 мМ±8 мМ аргинина; 50 мМ±10 мМ аргинина; 60 мМ±12 мМ аргинина; 70 мМ±14 мМ аргинина; около 70 мМ аргинина; или 70 мМ аргинина.

Фармацевтические составы по данному изобретению могут также содержать буфер или буферную систему, которая служит для поддержания стабильного уровня pH и для содействия стабилизации антитела к А-активину человека. В некоторых вариантах реализации изобретения под «стабилизацией» подразумевается, что по меньшей мере 90% антитела находится в его нативной конформации, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии, при хранении раствора, содержащего антитело и буфер, при около 2-8 °С в течение вплоть до около 18 месяцев, при около 25 °С в течение вплоть до около 6 месяцев или при около 40 °С в течение вплоть до около 56 суток. В некоторых вариантах реализации изобретения под «стабилизацией» подразумевается, что по меньшей мере 90% антитела находится в его нативной конформации, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии, при хранении раствора, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и буфер, при около 2-8 °С в течение вплоть до около 24 месяцев. Под «нативным» или «нативной конформацией» подразумевается фракция антитела, не подвергнувшаяся агрегации или деградации. Обычно это определяют с помощью анализа, в котором измеряют относительный размер молекулы антитела, такого как анализ с использованием эксклюзионной хроматографии. Не подвергнутое агрегации и фрагментации антитело элюируется во фракции, которая соответствует нативному антителу, и обычно она является главной элюированной фракцией. Подвергнутое агрегации антитело элюируется во фракции, которая демонстрирует размер молекулы, превышающий таковой нативного антитела. Подвергнутое фрагментации антитело элюируется во фракции, которая демонстрирует размер молекулы, меньший такового нативного антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения под «стабилизацией» подразумевается, что по меньшей мере 40% антитела находятся в его главной по заряду форме, как определено с помощью катионообменной хроматографии, при хранении раствора, содержащего антитело и буфер, при около 2-8 °С в течение вплоть до около 18 месяцев, при около 25 °С в течение вплоть до около 6 месяцев или при около 40 °С в течение

вплоть до около 56 суток. В некоторых вариантах реализации изобретения под «стабилизацией» подразумевается, что по меньшей мере 40% антитела находится в его главной по заряду форме, как определено с помощью катионообменной хроматографии, при хранении раствора, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и буфер, при около 2-8 °С в течение вплоть до около 24 месяцев. Под «главным зарядом» или «главной по заряду формой» подразумевается фракция антитела, которая при элюировании с ионообменной смолы соответствует главному пику, к которому обычно примыкают соответствующие более «основным» формам пики с одной стороны, и соответствующие более «кислым» формам пики с другой стороны.

Фармацевтические составы по данному изобретению могут иметь уровень pH от около 4,5 до около 7,0. Например, составы по данному изобретению могут иметь уровень pH около 4,5; около 4,6; около 4,7; около 4,8; около 4,9; около 5,0; около 5,1; около 5,2; около 5,3; около 5,4; около 5,5; около 5,6; около 5,7; около 5,8; около 5,9; около 6,0; около 6,1; около 6,2; около 6,3; около 6,4; около 6,5 или около 6,6. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень pH составляет $6,3 \pm 0,5$; $6,3 \pm 0,4$; $6,3 \pm 0,3$; $6,3 \pm 0,2$; $6,3 \pm 0,1$; около 6,3 или 6,3.

В некоторых вариантах реализации изобретения буфер или буферная система включает по меньшей мере один буфер, который поддерживает уровень pH в диапазоне, который полностью или частично покрывает диапазон значений уровня pH 5,5-7,4, как, например, буфер, который поддерживает уровень pH в пригодном диапазоне от уровня pH 4,8 до уровня pH 8,8. В одном варианте реализации изобретения буфер имеет уровень pH около 6,3. В определенных вариантах реализации изобретения буфер включает гистидиновый буфер. В определенных вариантах реализации изобретения гистидин присутствует в концентрации от $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ до $25 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$; от $6 \text{ mM} \pm 1,2 \text{ mM}$ до $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$; от $7 \text{ mM} \pm 1,4 \text{ mM}$ до $15 \text{ mM} \pm 3 \text{ mM}$; от $8 \text{ mM} \pm 1,6 \text{ mM}$ до $12 \text{ mM} \pm 2,4 \text{ mM}$; от $9 \text{ mM} \pm 1,8 \text{ mM}$ до $11 \text{ mM} \pm 2,2 \text{ mM}$; $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$; около 10 mM или 10 mM. В определенных вариантах реализации изобретения буферная система содержит фосфат в концентрации $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ при уровне pH $6,3 \pm 0,3$.

Иллюстративные составы

Согласно одному аспекту данного изобретения жидкий фармацевтический состав содержит: (i) $60 \text{ мг/мл} \pm 6 \text{ мг/мл}$ антитела человека, которое специфически связывается с А-активином человека (например, гаретосмаб); (ii) буферную систему, которая поддерживает pH на уровне около pH $6,3 \pm 0,3$; (iii) термостабилизатор, включающий сахар и соль; и (iv) органический соразтворитель.

Согласно одному варианту реализации изобретения фармацевтический состав содержит: (i) от $20 \pm 2 \text{ мг/мл}$ до $200 \pm 20 \text{ мг/мл}$ антитела человека, которое специфически связывается с А-активином человека; (ii) гистидиновый буфер, который поддерживает pH на уровне pH $6,3 \pm 0,3$; (iii) сахарозу и аргинин; и (iv) неионогенный детергент, такой как полисорбат.

Согласно одному варианту реализации изобретения фармацевтический состав содержит: (i) 50 мг/мл $\pm$ 5 мг/мл IgG1-антитела человека, которое специфически связывается с А-активином человека и которое содержит HCDR1 SEQ ID NO: 1, HCDR2 SEQ ID NO: 2, HCDR3 SEQ ID NO: 3, LCDR1 SEQ ID NO: 4, LCDR2 SEQ ID NO: 5 и LCDR3 SEQ ID NO: 6; (ii) 10 мМ $\pm$ 2 мМ гистидина, уровень pH 6,3 $\pm$ 0,3; (iii) 5% $\pm$ 1% сахарозы; (iv) 70 мМ $\pm$ 14 мМ аргинина; и (v) 0,05% $\pm$ 0,025% полисорбата 20.

Согласно одному варианту реализации изобретения фармацевтический состав содержит: (i) 60 мг/мл $\pm$ 6 мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с А-активином человека и которое содержит HCDR1 SEQ ID NO: 1, HCDR2 SEQ ID NO: 2, HCDR3 SEQ ID NO: 3, LCDR1 SEQ ID NO: 4, LCDR2 SEQ ID NO: 5 и LCDR3 SEQ ID NO: 6; (ii) 10 мМ $\pm$ 2 мМ гистидина, уровень pH 6,3 $\pm$ 0,3; (iii) 5% $\pm$ 1% сахарозы; (iv) 70 мМ $\pm$ 14 мМ аргинина; и (v) 0,05% $\pm$ 0,025% полисорбата 20.

Согласно одному варианту реализации изобретения фармацевтический состав содержит: (i) 70 мг/мл $\pm$ 7 мг/мл IgG1-антитела человека, которое специфически связывается с А-активином человека и которое содержит HCDR1 SEQ ID NO: 1, HCDR2 SEQ ID NO: 2, HCDR3 SEQ ID NO: 3, LCDR1 SEQ ID NO: 4, LCDR2 SEQ ID NO: 5 и LCDR3 SEQ ID NO: 6, в концентрации; (ii) 10 мМ $\pm$ 2 мМ гистидина, уровень pH 6,3 $\pm$ 0,3; (iii) 5% $\pm$ 1% сахарозы; (iv) 70 мМ $\pm$ 14 мМ аргинина; и (iv) 0,05% $\pm$ 0,025% полисорбата 20.

Согласно одному варианту реализации изобретения фармацевтический состав содержит: (i) 60 мг/мл $\pm$ 6 мг/мл антитела человека, которое специфически связывается с А-активином человека и которое содержит переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и переменный домен легкой цепи SEQ ID NO: 5; (ii) 10 мМ $\pm$ 2 мМ гистидина, уровень pH 6,3 $\pm$ 0,3; (iii) 5% $\pm$ 1% сахарозы; (iv) 70 мМ $\pm$ 14 мМ аргинина; и (v) 0,05% $\pm$ 0,025% полисорбата 20.

Иллюстративные составы и основные системы контейнер/упаковка, используемые в ходе доклинических и клинических этапов разработки гаретосмаба, перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Составы для лекарственного препарата на основе гаретосмаба, тестируемые в ходе первичных токсикологических исследований, клинические исследования 1 фазы и 2 фазы.

	Токсикологическая оценка	1 фаза	2 фаза/ коммерческий
Концентрация гаретосмаба	50 мг/мл	50 мг/мл	60 мг/мл
L-гистидин	10 мМ	10 мМ	10 мМ
Уровень pH	6,3	6,3	6,3
Сахароза	5% (мас./об.)	5% (мас./об.)	5% (мас./об.)

L-аргинин HCl	-	-	70 mM
Полисорбат 80	0,1% (мас./об.)	0,1% (мас./об.)	-
Полисорбат 20	-	-	0,05% (мас./об.)
Форма лекарственного препарата	Замороженная жидкость	Лиофилизированный	Жидкость
Основная система контейнер/укупорка	Стеклоянный флакон I типа с хлорбутилкаукуовой пробкой с покрытием FluroTec®	Стеклоянный флакон I типа с хлорбутилкаукуовой пробкой с покрытием FluroTec®	Стеклоянный флакон I типа с хлорбутилкаукуовой пробкой с покрытием FluroTec®

Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтических составов, охваченных данным изобретением, изложены в другом месте данного документа, включая нижеприведенные демонстрационные примеры.

Стабильность и устойчивость фармацевтических составов

Фармацевтические составы по данному изобретению, как правило, характеризуются высокими уровнями стабильности. Термин «стабильный», используемый в данном документе в отношении фармацевтических составов, означает, что у антител в фармацевтических составах в приемлемой степени сохраняется физическая и/или химическая структура или биологическая функция после хранения в определенных условиях. Состав может быть стабильным, даже если у содержащегося в нем антитела не сохраняется 100% его физической и/или химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. При определенных обстоятельствах, сохранение по меньшей мере около 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% структуры или функции антитела после хранения в течение определенного периода времени может рассматриваться как «стабильность».

Стабильность может быть измерена, среди прочего, путем определения процентной доли нативного антитела, которая сохраняется в составе после хранения в течение определенного периода времени при определенных температуре и/или относительной влажности (RH). Процентную долю нативного антитела можно определять, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной сверхпроизводительной жидкостной хроматографии [SE-UPLC]), обращенно-фазовой хроматографии (например, обращенно-фазовой сверхпроизводительной жидкостной хроматографии [RP-UPLC]) и/или капиллярного электрофореза на микрочипе (например, МСЕ в восстанавливающих условиях или МСЕ в невосстанавливающих условиях), при этом нативный означает не подвергнутый агрегации и фрагментации. В контексте данного

документа фраза «приемлемая степень стабильности» означает, что после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре в составе может быть выявлено по меньшей мере 90% нативной формы антитела. В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нативной формы антитела может быть выявлено в составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре. Определенный промежуток времени, спустя который можно измерять стабильность, может составлять по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 14 суток, по меньшей мере 21 сутки, по меньшей мере 28 суток, по меньшей мере 56 суток, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяцев или больше. Определенная температура, при которой можно хранить фармацевтический состав при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около -80 °C до около 45 °C, например, предусматривается хранение при около -80 °C, около -30 °C, около -20 °C, около 0 °C, около 2 °-8 °C, около 5 °C, около 25 °C, около 40 °C или около 45 °C. Определенная относительная влажность (RH), при которой можно хранить фармацевтический состав при оценке стабильности, может составлять около 20-90% RH, около 20% RH, около 25% RH, около 30% RH, около 35% RH, около 40% RH, около 45% RH, около 50% RH, около 55% RH, около 60% RH, около 65% RH, около 70% RH, около 75% RH, около 80% RH, около 85% RH или около 90% RH. Для оценки стабильности, по отношению к фармацевтическому составу можно применять стрессовые условия, например, перемешивание на вортексе или замораживание и размораживание. Стрессовые условия включают, например, перемешивание на вортексе раствора с антителом и органическим сорастворителем в течение около 30 минут, 60 минут или около 120 минут или замораживание и размораживание раствора с антителом и органическим сорастворителем на протяжении 4 циклов или 8 циклов. Для оценки стабильности, по отношению к фармацевтическому составу можно применять термический стресс. Термический стресс включает, например, выдерживание состава в течение около 14 суток, около 28 суток или около 56 суток при около 25 °C, около 35 °C, около 37 °C, около 40 °C или около 45 °C. В определенных вариантах реализации изобретения стрессовое условие по отношению к фармацевтическому составу можно применять в течение около 56 суток при около 40 °C и около 75% RH.

Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если спустя двадцать четыре месяца хранения при 2-8 °C по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, выявляемых с помощью SE-UPLC, RP-UPLC или MCE, являются нативными (т. е. обнаруживаются в нативной пиковой фракции). Фармацевтический состав может считаться стабильным, если спустя восемнадцать месяцев хранения при 2-8 °C по меньшей

[illegible]

меньшей мере 99% или 99,5% антитела, выявляемого с помощью SE-UPLC, RP-UPLC или MCE, является нативным. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если спустя шесть месяцев хранения при -80 °C по меньшей мере 99% или 99,5% антитела, выявляемого с помощью SE-UPLC, является нативным.

Стабильность может быть измерена, среди прочего, путем определения процентной доли антитела, которое перемещается в главной фракции антитела («главная по заряду форма») в процессе ионного обмена, относительно общей объединенной площади пиков, причем стабильность пропорциональна фракции антитела в главной по заряду форме. Форму по заряду можно определять с помощью, среди прочего, катионообменной хроматографии (например, катионообменной сверхпроизводительной жидкостной хроматографии [CEX-UPLC]) или изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра (iCIEF). Не вдаваясь в теорию, дезамидирование антитела может приводить к тому, что антитело становится более отрицательно заряженным и, следовательно, более кислым по сравнению с антителом, не подвергнутым дезамидированию (см., например, Robinson, N., Protein Deamidation, *PNAS*, April 16, 2002, 99(8):5283-5288). В контексте данного документа фраза «приемлемая степень стабильности» означает, что после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре в составе выявляется по меньшей мере 30% антитела в главной по заряду форме. В определенных вариантах реализации изобретения приемлемая степень стабильности означает, что после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре или в условиях термического стресса, замораживания/размораживания или перемешивания можно выявить по меньшей мере около 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% антитела в главной по заряду форме. Определенный промежуток времени, спустя который можно измерять стабильность, может составлять по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 14 суток, по меньшей мере 28 суток, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяцев или больше. Температура, при которой можно хранить фармацевтический состав при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около -80 °C до около 45 °C, например, предусматривается хранение при около -80 °C, около -30 °C, около -20 °C, около 0 °C, около 2-8 °C, около 5 °C, около 25 °C, около 37 °C, около 40 °C или около 45 °C. Относительная влажность (RH), при которой можно хранить фармацевтический состав при оценке стабильности, может составлять около 20-90% RH, около 20% RH, около 25% RH, около 30% RH, около 35% RH, около 40% RH, около 45% RH, около 50% RH, около 55% RH, около 60% RH, около 65% RH, около 70% RH, около 75% RH, около 80% RH, около 85% RH или около 90% RH. Например, фармацевтический

состав может считаться стабильным, если спустя 24 месяца хранения при 2-8 °C не менее чем около 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% или 61% антитела или его антигенсвязывающего фрагмента находится в главной по заряду форме. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если спустя 18 месяцев хранения при 2-8 °C не менее чем около 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% или 61% антитела находится в главной по заряду форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если спустя шесть месяцев хранения при 25°C и 60% RH не менее чем около 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% или 61% антитела находится в главной по заряду форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если спустя шесть месяцев хранения при 25 °C не менее чем около 45% антитела находится в главной по заряду форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если спустя 56 суток хранения при 40 °C и 75% RH не менее чем около 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% или 61% антитела находится в главной по заряду форме. Фармацевтический состав также может считаться стабильным, если спустя 56 суток хранения при 40 °C не менее чем около 34% антитела можно выявить в главной по заряду форме.

Измерение аффинности связывания антитела с его мишенью также можно использовать для оценки стабильности или активности. Термин «активность» относится к любому из факторов, которые вносят вклад в функциональность или биологическую активность антитела в отношении распознавания антигена. Активность можно оценивать с помощью анализов связывания лиганда или функциональных анализов, например, ELISA, проточной цитометрии и/или других клеточных анализов *in vitro*. Например, состав по данному изобретению может рассматриваться как стабильный, если после хранения, например, при -80 °C, -30 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C и т. д. в течение определенного периода времени (например, от 7 суток до 24 месяцев), антитело к А-активину, содержащееся в составе, сохраняет по меньшей мере 50% и вплоть до около 150% активности, измеряемой в виде аффинности связывания, от таковой антитела до указанного хранения. Аффинность связывания можно определять, например, с помощью ELISA или метода поверхностного плазмонного резонанса. Биологическую активность можно определять с помощью анализа активности с использованием А-активина, как, например, путем приведения клетки, которая экспрессирует А-активин, в контакт с составом, содержащим антитело к А-активину. Связывание антитела с такой клеткой можно измерять напрямую, как, например, посредством FACS-анализа. В качестве альтернативы, нисходящую активность сигнального пути с участием А-активина можно измерять в присутствии антитела и сравнивать с активностью сигнального пути с участием А-активина при отсутствии антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения А-активин может быть эндогенным по отношению к клетке. В других вариантах реализации изобретения А-активин может эктопически (гетерологично) экспрессироваться в клетке.

Дополнительные способы оценки стабильности антитела в составе продемонстрированы в примерах, представленных ниже.

Контейнеры и способы введения

Фармацевтические составы по данному изобретению могут содержаться в любом контейнере, подходящем для хранения или введения лекарств и других терапевтических композиций. Например, фармацевтические составы могут содержаться в запечатанном и стерилизованном пластиковом или стеклянном контейнере определенного объема, таком как флакон, ампула, шприц, картридж, бутылка или мешок для IV вливаний. Для содержания составов по данному изобретению можно использовать разные типы флаконов, включая, например, прозрачные и непрозрачные (например, из темного стекла) стеклянные или пластиковые флаконы. Подобным образом, для содержания или введения фармацевтических составов по данному изобретению можно использовать шприц любого типа.

Фармацевтические составы по данному изобретению могут содержаться в шприцах со стандартным следовым количеством вольфрама или сниженным следовым количеством вольфрама. Как будет понятно специалистам в данной области техники, процесс получения стеклянных шприцов обычно включает применение горячего вольфрамового стержня, который прокалывает стекло, тем самым создавая отверстие, через которое можно втягивать жидкости в шприц и выталкивать их из шприца. В результате этого процесса происходит отложение следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца. Последующую промывку и другие этапы обработки можно использовать для снижения количества вольфрама в шприце. В контексте данного документа термин «со стандартным следовым количеством вольфрама» означает, что шприц содержит 500 или более частей на миллиард (ppb) вольфрама. Термин «со сниженным следовым количеством вольфрама» означает, что шприц содержит менее 500 ppb вольфрама. Например, шприц со сниженным следовым количеством вольфрама согласно данному изобретению может содержать менее чем около 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или меньше ppb вольфрама.

Резиновые плунжеры, используемые в шприцах, и резиновые пробки, используемые для закрытия отверстий флаконов, могут иметь покрытие для предотвращения контаминации лекарственного содержимого шприца или флакона или для сохранения их стабильности. Таким образом, фармацевтические составы по данному изобретению, согласно определенным вариантам реализации изобретения, могут содержаться в шприце, который содержит плунжер с покрытием, или во флаконе, запечатанном с помощью резиновой пробки с покрытием. Например, плунжер или пробка могут быть покрыты фторуглеродной пленкой. Примеры пробок или плунжеров с покрытием, подходящих для применения с флаконами и шприцами, содержащими фармацевтические составы по данному изобретению, упоминаются, например, в заявках на выдачу патента США №№ 4997423; 5908686; 6286699; 6645635 и 7226554, содержания которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Конкретные иллюстративные резиновые

пробки и плунжеры с покрытием, которые можно использовать в контексте данного изобретения, являются коммерчески доступными под торговым названием «FluroTec®», и они доступны от West Pharmaceutical Services, Inc. (Лайонвилль, Пенсильвания). FluroTec® является примером фторуглеродного покрытия, используемого для сведения к минимуму или предотвращения прилипания лекарственного препарата к резиновым поверхностям.

Согласно определенным вариантам реализации данного изобретения фармацевтические составы могут содержаться в шприце со сниженным следовым количеством вольфрама, который содержит плунжер с фторуглеродным покрытием.

Фармацевтические составы можно вводить пациенту посредством парентеральных путей, таких как инъекция (например, подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутрибрюшинная и т. д.), или посредством перкутанного, мукозального, назального, легочного или перорального введения. Для подкожной доставки фармацевтических составов по данному изобретению можно использовать множество устройств для доставки в виде шприц-ручки или автоинжектора многоразового использования. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия). Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприц-ручки или автоинжектора, которые можно применять для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эбботт-Парк, Иллинойс).

Применение микроинфузора для доставки фармацевтических составов по данному изобретению также включено в данный документ. В контексте данного документа термин «микроинфузор» означает устройство для подкожной доставки, предназначенное для медленного введения больших объемов (например, вплоть до около 2,5 мл или больше) терапевтического состава в течение продолжительного периода времени (например, около 10, 15, 20, 25, 30 или более минут). См., например, U.S. 6629949; US 6659982; и Meehan *et al.*, *J. Controlled Release* 46:107-116 (1996). Микроинфузоры особенно полезны для доставки больших доз терапевтических белков, содержащихся в высокой концентрации (например, около 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл) или в вязких растворах.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтический состав вводят посредством IV капельного вливания, так что состав разводят в мешке для IV вливаний, содержащем физиологически приемлемый раствор. В одном варианте реализации

изобретения фармацевтическая композиция представляет собой экстемпоральный стерильный препарат в мешке для внутривенной инфузии, так что однократную дозу лекарственного препарата разводят в 100 мл, 250 мл (или другом подобном количестве, подходящем для доставки посредством внутривенного капельного вливания) физиологического буфера (например, 0,9% солевого раствора). В некоторых вариантах реализации изобретения инфузионный мешок выполнен из поливинилхлорида (например, VIAFLEX, Baxter, Дирфилд, Иллинойс). В некоторых вариантах реализации изобретения инфузионный мешок выполнен из полиолефина (мешки для IV вливаний EXCEL, Braun Medical Inc., Бетлехем, Пенсильвания).

Варианты терапевтического применения фармацевтических составов

Фармацевтические составы по данному изобретению являются пригодными, среди прочего, для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности любого заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью А-активина, включая опосредованные А-активином заболевания или нарушения. Иллюстративные неограничивающие заболевания и нарушения, которые можно лечить или предупреждать путем введения фармацевтических составов по данному изобретению, включают прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию (FOP). FOP представляет собой редкое наследственное нарушение, при котором гетеротопическая оссификация приводит к формированию «нормальной» с гистологической и биомеханической точки зрения кости в участках вне скелета, таких как соединительная ткань. Это нарушение, несмотря на эпизодичность, является кумулятивным, и приводит к инвалидности увеличивающейся степени тяжести. FOP является беспрестанным, прогрессирующим, крайне редким генетическим нарушением, при котором мышцы, сухожилия и связки постепенно замещаются костью, что является процессом, известным как гетеротопическая оссификация (НО). НО челюсти, позвоночника и грудной клетки может затруднять речь, прием пищи или дыхание, что приводит к потере массы тела и нарастающей потере подвижности и деформации скелета. Люди с FOP также испытывают эпизодическое локальное воспаление, известное как «внезапные обострения», хотя НО может возникать как бессимптомно, так и в сочетании с симптомами. Большинство людей с FOP становятся прикованными к инвалидной коляске к 30 годам, а медианный возраст выживания составляет примерно 40 лет. Смерть часто наступает в результате осложнений, таких как пневмония, сердечная недостаточность и аспирация, вызванных НО и потерей подвижности грудной клетки, шеи и челюсти.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры представлены с целью предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания того, как выполнять и применять способы и композиции по данному изобретению, и они не предназначены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения рассматривают как свое изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых значений (например, количеств, температуры и т. д.), однако следует учитывать наличие некоторых

погрешностей и отклонений в экспериментах. Если не указано иное, части являются частями в молях, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, процентная концентрация (%) означает массу растворенного вещества в граммах, деленную на объем раствора в миллилитрах, умноженную на 100% (например, 10% сахарозы означает 0,1 грамма сахарозы на миллилитр раствора), температура измеряется в градусах Цельсия и давление представляет собой атмосферное давление или близкое к нему. Изначальные виды деятельности по разработке состава включали скрининг органических сорастворителей, термостабилизаторов и буферов в жидких и лиофилизированных составах антител к А-активину с целью идентификации вспомогательных веществ, которые являются совместимыми с белком и повышают его стабильность, с поддержанием при этом осмоляльности, близкой к физиологической, и низкой вязкости для внутривенной и подкожной инъекции. Также изучали буферные условия для определения оптимального уровня pH с целью обеспечения максимальной стабильности белка.

Пример 1. Иллюстративный состав на основе антитела к А-активину

Для исследований, предусматривающих первое применение препарата у людей (First in Human, FIH), был разработан лиофилизированный лекарственный препарат (drug product, DP) для применения как для внутривенного (IV), так и для подкожного (SC) введения. Состав для FIH был разработан с помощью оценки эффектов разных компонентов состава в отношении стабильности антитела к А-активину, например, гаретосмаба. Эти компоненты включали уровень pH, буфер, термостабилизаторы и поверхностно-активные вещества. Основные пути деградации гаретосмаба представляют собой образование молекул с высокой и низкой молекулярной массой и кислотных вариантов, отличающихся зарядом. Для отслеживания этих продуктов деградации были разработаны способы анализа. Кроме того, отслеживали общие качественные характеристики. Они включали концентрацию белка, уровень pH, растворимость и биологическую активность. На основании проведенных исследований по разработке состава был разработан лиофилизированный состав, который включал гистидин при уровне pH 6,3, сахарозу и полисорбат 80. Лيوфилизированный состав, разработанный для FIH, был стабилен в течение по меньшей мере 36 месяцев.

В клиническом исследовании 1 фазы гаретосмаб доставлялся с помощью IV- и SC-введения. Был разработан единый лиофилизированный состав для двух типов применения, в случае которого лиофилизированный DP на основе гаретосмаба восстанавливали с помощью стерильной воды для инъекций (WFI) до концентрации либо 50 мг/мл гаретосмаба для IV инфузии, либо 150 мг/мл гаретосмаба для SC инъекции. Виды деятельности по разработке состава включали оценку буферов, уровня pH, органических сорастворителей, поверхностно-активных веществ и сахарозы (в качестве термостабилизатора) с целью идентификации вспомогательных веществ, которые обеспечивают оптимизацию стабильности белка. DP на основе гаретосмаба был получен путем лиофилизации оптимизированного водного забуференного состава, содержащего 10 mM гистидина, уровень pH 6,3, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, 5% (мас./об.) сахарозы и 50

мг/мл гаретосмаба. В таблице 2 представлена композиция DP на основе гаретосмаба после восстановления разными объемами WFI для IV- или SC-введения.

Таблица 2. Композиция DP на основе гаретосмаба для исследований, предусматривающих первое применение препарата у людей, после восстановления разными объемами WFI для IV- или SC-введения.

Компонент состава	Восстановленный для IV-введения	Восстановленный для SC-введения
Гаретосмаб	50 мг/мл	150 мг/мл
Гистидин	10 mM	30 mM
Сахароза	5%	15%
Полисорбат 80	0,1%	0,3%
уровень pH	6,3	6,3

DP, лекарственный препарат; IV, внутривенное; SC, подкожное; WFI, вода для инъекций

Эффект буфера и уровня pH в отношении термостабильности гаретосмаба изначально изучали в жидких составах путем инкубирования 5 мг/мл гаретосмаба при 45 °C в течение 28 суток в серии буферных систем при различных диапазонах уровня pH. Максимальную стабильность белка наблюдали в случае, когда гаретосмаб был составлен с уровнем pH 5,5-6,5 в 10 mM гистидиновом буфере (таблица 3). Эффект уровня pH в отношении термостабильности гаретосмаба дополнительно изучали в жидких составах в гистидиновых буферах с диапазоном уровня pH 6,0-6,6. Для состава DP был выбран уровень pH 6,3, поскольку при этом уровне pH имело место минимальное образование соединений с высокой молекулярной массой (HMW) (таблица 4). Этот целевой уровень pH также позволит установить подходящий диапазон уровня pH для максимальной стабильности, которая может быть достигнута в условиях крупномасштабного производства. Исходя из этих результатов, для состава DP на основе гаретосмаба был выбран 10 mM гистидиновый буфер с уровнем pH 6,3.

Эффект поверхностно-активных веществ и органических сорастворителей в отношении стабильности при воздействии стрессовых условий в виде перемешивания, стабильности при замораживании/размораживании и термостабильности 10 мг/мл гаретосмаба изучали в жидких составах. Результаты этих исследований приведены в таблицах 5-8. Гаретосмаб был нестабилен при перемешивании при отсутствии органического сорастворителя или поверхностно-активного вещества. Все тестируемые органические сорастворители и поверхностно-активные вещества защищали гаретосмаб от индуцированной перемешиванием нестабильности (таблица 5). 10 мг/мл гаретосмаб был

нестабильным при воздействии нескольких циклов замораживания/размораживания при отсутствии органического сорастворителя или поверхностно-активного вещества (таблица 6). Все тестируемые органические сорастворители и поверхностно-активные вещества защищали гаретосмаб от индуцированной замораживанием/размораживанием нестабильности (таблица 6). В последующем исследовании, в котором 70 мг/мл гаретосмаб подвергали восьми циклам замораживания и размораживания, не наблюдали каких-либо визуальных дефектов или повышений содержания НМВ-соединений, даже в растворах, которые не содержали поверхностно-активное вещество или сорастворитель (таблица 7). Концентрация 70 мг/мл является репрезентативной в ряде концентраций гаретосмаба, которые подвергали замораживанию и размораживанию в производственных условиях в ходе клинических испытаний гаретосмаба. В качестве поверхностно-активного вещества для первоначального состава DP на основе гаретосмаба был выбран полисорбат 80, поскольку он обеспечивал стабилизацию белка при воздействии стрессовых условий в виде перемешивания и защиту от индуцированной замораживанием/размораживанием нестабильности и оказывал минимальное неблагоприятное влияние на термостабильность, демонстрируя при этом безопасную историю применения в составах на основе моноклональных антител (таблицы 5-8).

Оценивали стабилизирующий эффект сахарозы в отношении гаретосмаба. 10 мг/мл гаретосмаб в жидком составе проявлял повышенную стабильность при составлении с 5% сахарозой, в сравнении с отсутствием сахарозы, и инкубировании в режиме ускоренного старения (таблица 8). Гаретосмаб был достаточно стабильным для начального клинического применения при составлении в присутствии гистидина, полисорбата 80 и сахарозы, с уровнем pH 6,3.

На основании результатов начальных исследований по разработке состава, для клинического применения был выбран следующий состав: 50 мг/мл гаретосмаба, 10 мМ гистидина, уровень pH 6,3, 5% (мас./об.) сахарозы и 0,1% (мас./об.) полисорбата 80. DP был получен путем заполнения 5,74 мл этого состава 20 мл стеклянных флаконов и лиофилизации. Результаты по стабильности в ходе исследования показали, что этот состав был стабильным в течение 36 месяцев (таблица 9).

Таблица 3. Эффект буфера и уровень pH в отношении стабильности 5 мг/мл гаретосмаба, инкубированного при 45 °С в течение 28 суток.

Состав		5 мг/мл гаретосмаб, 10 mM буфер								
Объем наполнения		0,4 мл								
Контейнер/упковка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®								
уровень pH/буфер	Номер партии и FDG	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC^a			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC^a		
					% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
уровень pH 4,5, ацетатный	L13-322	Проверка пройдена	0,00	102	2,5	-4,3	1,9	-5,4	-16,4	21,8
уровень pH 5,0, ацетатный	L13-323	Проверка пройдена	0,00	96	1,6	-3,2	1,6	-0,9	-14,6	15,5
уровень pH 5,5, ацетатный	L13-324	Проверка пройдена	0,00	106	1,4	-1,9	0,5	11,0	-11,3	0,4

уровень pH 5,5, гистидиновый	L13- 325	Проверка пройдена	0,00	92	1,2	-2,2	1,0	3,6	-7,9	4,3
уровень pH 6,0, гистидиновый	L13- 326	Проверка пройдена	0,01	100	0,8	-1,8	1,0	8,7	-11,6	2,9
уровень pH 6,5, гистидиновый	L13- 327	Проверка пройдена	0,00	97	1,0	-1,3	0,3	17,2	-16,7	-0,5
уровень pH 6,5, фосфатный	L13- 328	Проверка пройдена	0,00	95	2,5	-2,9	0,3	20,3	-17,2	-3,0
уровень pH 7,0, фосфатный	L13- 329	Проверка пройдена	0,00	94	2,9	-3,6	0,7	36,2	-31,4	-4,8

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала; исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,5\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 55,8\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах.

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Таблица 4. Эффект уровня pH в отношении стабильности 25 мг/мл гаретосмаба, инкубированного при 45 °С в течение 28 суток.

Состав		25 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин								
Объем наполнения		0,5 мл								
Контейнер/упорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®								
Уровень pH/буфер	Номер партии FDG	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC^a		
					% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
уровень pH 6,0, гистидиновый	L13-1003	Проверка пройдена	0,01	95	2,3	-6,2	3,7	3,8	-11,0	7,2
уровень pH 6,1, гистидиновый	L13-1004	Проверка пройдена	0,00	99	1,5	-3,6	2,0	6,2	-12,8	6,6

уровень pH 6,2, гистидиновый	L13- 1005	Проверка пройдена	0,00	97	1,2	-2,7	1,4	8,8	-14,1	5,3
уровень pH 6,3, гистидиновый	L13- 1006	Проверка пройдена	0,00	100	1,4	-2,4	1,0	10,6	-14,6	4,0
уровень pH 6,4, гистидиновый	L13- 1007	Проверка пройдена	0,00	100	1,4	-2,1	0,7	12,1	-14,7	2,6
уровень pH 6,5, гистидиновый	L13- 1008	Проверка пройдена	0,01	100	1,5	-2,2	0,6	13,2	-15,6	2,5
уровень pH 6,6, гистидиновый	L13- 1009	Проверка пройдена	0,01	99	1,8	-2,0	0,2	15,2	-18,1	2,9

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала; исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,6\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 64,7\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах.

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Таблица 5. Эффект органических сорастворителей и поверхностно-активных веществ в отношении стабильности 10 мг/мл гаретосмаба после перемешивания (120 минут перемешивания на вортексе).

Состав		10 мг/мл гаретосмаб, 10 mM гистидин, уровень pH 6,0									
Объем наполнения		0,4 мл									
Контейнер/упорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluorTec®									
Сораствори тель/поверх ностно- активное вещество	Номер партии FDG	Цвет и внешний вид	Мутность (повышен ие OD при 405 нм)	урове нь pH	% Общего белка, извлеченно го с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC^a		
						% HMW	% Нати вного	% LM W	% Кисл отног о	% Глав ного	% Осно вного

Без сорастворит еля/поверхн остно- активного вещества	L13- 468	Проверка пройдена	0,13	6,1	101	0,5	-0,5	-0,1	-0,4	0,3	0,1
5% (мас./об.) сахароза	L13- 469	Проверка пройдена	0,16	6,1	98	0,8	-0,8	0,0	-0,4	0,3	0,1
0,1% (мас./об.) полисорбат 20, 5% сахароза	L13- 470	Проверка пройдена	0,00	6,1	100	-0,1	0,1	0,0	-0,1	0,2	-0,1
0,1% (мас./об.) полисорбат 80, 5% сахароза	L13- 471	Проверка пройдена	0,00	6,1	100	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,2	0,0

0,5% (мас./об.) PEG3350, 5% сахара	L13- 472	Проверка пройдена	0,00	6,1	100	0,0	0,1	0,0	-0,2	0,8	-0,6
1,5% (мас./об.) PEG3350, 5% сахара	L13- 473	Проверка пройдена	0,00	6,1	100	0,0	0,1	0,0	-0,2	0,3	-0,1

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала; исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 55,5\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех пяти составах.

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Таблица 6. Эффект органических сорастворителей и поверхностно-активных веществ в отношении стабильности 10 мг/мл гартосмаба после восьми циклов замораживания и размораживания.

Состав		10 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,0									
Объем наполнения		0,4 мл									
Контейнер/упорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучкуовой пробкой 4432/50 с покрытием FluorTec®									
Сорастворитель/поверхностно-активное вещество	Номер партии FDG	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
Без сорастворителя/поверхностно-активного вещества	L13-468	Проверка не пройдена	0,47	6,1	107	0,0 ²⁾	0,0 ^b	0,0 ^b	-0,1	0,1	0,0

5% (мас./об.) сахароза	L13- 469	Проверка не пройдена	0,40	6,1	97	1,0	-1,0	0,0	-0,1	0,1	0,0
0,1% (мас./об.) полисорбат 20, 5% сахароза	L13- 470	Проверка пройдена	0,00	6,1	102	-0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	-0,1
0,1% (мас./об.) полисорбат 80, 5% сахароза	L13- 471	Проверка пройдена	0,00	6,1	102	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	-0,5
0,5% (мас./об.) PEG3350, 5% сахароза	L13- 472	Проверка пройдена	0,00	6,1	105	-0,1	0,2	-0,1	-0,1	0,3	-0,1

1,5% (мас./об.) PEG3350, 5% сахара	L13- 473	Проверка пройдена	0,00	6,1	104	-0,1	0,2	-0,1	0,2	-0,4	0,2
---	-------------	----------------------	------	-----	-----	------	-----	------	-----	------	-----

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала; исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 55,5\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех пяти составах.

^b Значения для четырех циклов замораживания/размораживания: $\Delta\text{HMW}=0,5\%$, $\Delta\text{нативный}=-0,4\%$ и $\Delta\text{LMW}=0,0\%$

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Таблица 7. Эффект органических сорастворителей и поверхностно-активных веществ в отношении стабильности 70 мг/мл гаретосмаба после восьми циклов замораживания и размораживания.

Состав		70 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,0									
Объем наполнения		0,4 мл									
Контейнер/упорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучкуовой пробкой 4432/50 с покрытием FluorTec®									
Сораствори тель/поверх ностно- активное вещество	Номер партии FDG	Цвет и внешний вид	Мутность (повышен ие OD при 405 нм)	урове нь pH	% Общего белка, извлеченно го с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC^a		
						% HM W	% Натив ного	% LM W	% Кисл отног о	% Глав ного	% Осно вного
Без сорастворит еля/поверхн остно- активного вещества	L13- 595	Проверка пройдена	0,03	6,1	102	0,0	-0,1	0,1	-0,2	0,1	0,1

5% (мас./об.) сахароза	L13- 596	Проверка пройдена	0,02	6,1	100	-0,1	-0,1	0,2	-0,3	0,3	0,0
0,1% (мас./об.) полисорбат 80, 5% сахароза	L13- 597	Проверка пройдена	0,01	6,1	102	-0,1	0,0	0,1	-0,3	0,3	0,0
0,5% (мас./об.) PEG3350, 5% сахароза	L13- 598	Проверка пройдена	0,01	6,1	99	-0,1	0,0	0,1	-0,4	0,4	-0,1

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала; исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,6\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 56,3\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех пяти составах.

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Таблица 8. Эффект органических соразтворителей и поверхностно-активных веществ в отношении стабильности 10 мг/мл гаретосмаба, инкубированного при 45 °C в течение 28 суток.

Состав		10 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,0									
Объем наполнения		0,4 мл									
Контейнер/упорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучкуовой пробкой 4432/50 с покрытием FluorTec®									
Сораствори тель/поверх ностно- активное вещество	Номер партии FDG	Цвет и внешний вид	Мутность (повышен ие OD при 405 нм)	урове нь pH	% Общего белка, извлеченно го с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC^a		
						% HM W	% Натив ного	% LM W	% Кисл отног о	% Глав ного	% Осно вного
Без сорастворит еля/поверхн остно- активного вещества	L13- 468	Проверка пройдена	0,00	6,2	98	0,9	-3,2	2,4	9,1	-12,5	3,5

5% (мас./об.) сахароза	L13- 469	Проверка пройдена	0,00	6,1	101	0,6	-2,7	2,0	10,2	-13,0	2,8
0,1% (мас./об.) полисорбат 20, 5% сахароза	L13- 470	Проверка пройдена	0,01	6,0	101	6,1	-8,1	2,1	12,1	-22,2	10,1
0,1% (мас./об.) полисорбат 80, 5% сахароза	L13- 471	Проверка пройдена	0,01	6,1	101	4,2	-6,6	2,3	13,2	-24,5	11,3
0,5% (мас./об.) PEG3350, 5% сахароза	L13- 472	Проверка пройдена	0,01	6,1	101	1,2	-3,1	2,0	14,1	-17,4	3,3
1,5% (мас./об.) PEG3350, 5% сахароза	L13- 473	Проверка пройдена	0,02	6,0	103	5,7	-8,1	2,4	14,9	-28,4	13,5

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала; исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 55,5\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех пяти составах.

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; LMW, низкая молекулярная масса; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

[illegible]

		де на	пр ой де на	ден а	ден а	ден а	ден а	ден а	ден а	ден а
Мутность (повышение OD при 405 нм)		0,0 0	0, 01	0,0 0	0,0 0	0,0 0	0,0 0	0,0 0	0,0 0	0,0 0
уровень pH		6,4	6, 3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
Гранул ометри ческий анализ с помощ ью MFI	2-10 мкм	11 68	N R	NR	274 4	NR	112 2	NR	194 1	635 7
	≥ 10 мкм	15	N R	NR	48	NR	17	NR	6	121
	≥ 25 мкм	7	N R	NR	10	NR	4	NR	0	7
% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC		10 0	94	96	93	94	95	95	96	94
Чистот а, измере нная с помощ ью MCE- SDS	Невосстанавл ивающие условия; % пика главного компонента	10 0	N R	NR	100	NR	100	NR	100	100
	Восстанавлив ающие условия; % тяжелая+легк ая цепь	10 0	N R	NR	100	NR	100	NR	100	100
Чистот а,	% HMW	0,8	0, 8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,2

измеренная с помощью SE-UPLC	% Нативного	98,7	98,8	98,6	98,5	98,5	98,5	98,5	98,3	97,8
	% LMW	0,5	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	1,1
Анализ вариантов, отличающихся зарядом, с помощью CEX-UPLC	% Кислотного	31,4	31,6	30,7	31,4	31,5	31,7	32,7	32,0	32,2
	% Главного	53,4	52,5	51,3	52,3	51,6	52,7	50,2	51,6	52,4
	% Основного	15,1	15,9	18,0	16,3	17,0	15,6	17,1	16,4	15,4
Анализ вариантов, отличающихся зарядом, с помощью iCIEF	% Кислотного	48,4	NR	NR	44,6	NR	48,5	NR	49,8	49,0
	% Главного	48,4	NR	NR	51,5	NR	46,3	NR	43,6	45,7
	% Основного	3,2	NR	NR	3,9	NR	5,1	NR	6,6	5,3
% Относительной активности, измеренный с помощью биологического анализа		103	NR	NR	114	NR	135	NR	106	95

^a Образцы были восстановлены с помощью стерильной воды для инъекций до концентрации 100 мг/мл гаретосмаба.

C1P2, линия клеток 1, способ 2; CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; iCIEF, изоэлектрическое фокусирование с постоянным детектированием по всей длине капилляра; LMW, низкая молекулярная масса; MCE-SDS, капиллярный электрофорез на микрочипе с додецилсульфатом натрия; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, не требуется; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография.

Пример 2. Иллюстративные составы на основе антитела к А-активину

Задачей деятельности по коммерческой разработке лекарственного препарата (DP) была разработка DP на основе антитела к А-активину (например, гаретосмаба) со следующими характеристиками: жидкий состав в стеклянных флаконах с концентрацией гаретосмаба, достаточной для доставки гаретосмаба в дозе 10 мг/кг путем внутривенной (IV) инфузии; флакон гаретосмаба должен содержать 300 мг в 5 мл; близкий к изотоническому состав, который можно разводить для IV инфузии распространенными разбавителями; состав, совместимый с прозрачными стеклянными флаконами 1 типа и стандартной резиновой пробкой в качестве первичной упаковочной системы, и стабильный в такой упаковке; стерильный DP, который сохраняет долгосрочную стабильность, при этом срок его хранения составляет 24 месяца или больше при 2-8 °C; устойчивый состав, в котором сводится к минимуму образование соединений гаретосмаба с высокой молекулярной массой (HMW), сводятся к минимуму изменения в отношении относительного распределения вариантов соединений гаретосмаба, отличающихся зарядом, сводится к минимуму присутствие видимых и невидимых невооруженным глазом частиц и сохраняется биологическая активность при воздействии стрессовых условий при манипуляциях и термического стресса; и состав, в котором будут стабилизироваться высокие концентрации гаретосмаба и который будет обладать характеристиками, приемлемыми для подкожного (SC) введения.

В этом исследовании описывается оптимизация состава в поздней фазе, утверждение коммерческого состава на основе гаретосмаба и устойчивость гаретосмаба. Коммерческий состав на основе гаретосмаба представляет собой жидкость, содержащую 60 мг/мл гаретосмаба в водном растворе, содержащем 10 mM L-гистидина, уровень pH 6,3, 5% (мас./об.) сахарозы, 70 mM L-аргинина HCl и 0,05% (мас./об.) полисорбата 20. Этот состав обеспечивает стабилизацию гаретосмаба в ходе долгосрочного хранения при 2-8 °C и при воздействии режима ускоренного старения и стрессовых условий, включая перемешивание, замораживание и размораживание и термический стресс. Для клинических исследований 2 фазы и коммерциализации была разработана жидкий состав DP, подходящий для IV введения. Этот состав был создан на основе данных, полученных в ходе первичной разработки и данных дополнительных исследований по разработке состава, проведенных для уточнения и оптимизации состава для конкретных клинических показаний и

оптимизации стабильности продукта. Состав на основе гаретосмаба состоит из следующего: 60 мг/мл гаретосмаба, 10 мМ гистидина, уровень pH 6,3, 5% сахарозы, 70 мМ аргинина-HCl и 0,05% полисорбата 20. DP изготовлен путем наполнения 5,61 мл в стеклянный флакон на 10 мл и запечатывания эластомерной пробкой. Были начаты исследования по долгосрочной стабильности, и по их результатам было показано, что состав является стабильным в течение по меньшей мере 12 месяцев. Исследования по стабильности будут продолжаться в течение 60 месяцев. Были начаты исследования по устойчивости. К настоящему моменту по результатам исследований по долгосрочной стабильности, стабильности при воздействии режима ускоренного старения и стрессовых условий показано, что состав является устойчивым в отношении уровня pH, концентрации белка и концентрации вспомогательных веществ. Небольшие вариации, которые могут возникнуть в процессе производства, не оказывают существенного влияния на качество DP на основе гаретосмаба.

В результате исследований по фармацевтической разработке, проводимых в процессе разработки гаретосмаба, был получен стабильный состав на основе гаретосмаба, соответствующий целям, поставленным для удовлетворения клинических и коммерческих потребностей. Целью поздней стадии клинической разработки было получение состава, который бы обеспечивал доставку 300 мг гаретосмаба в 5 мл раствора. Вторичной целью было получение состава, который можно было бы легко преобразовать в состав для подкожного введения для будущего применения. Исследования по разработке состава проводили с целью разработки жидкого состава, содержащего 60 мг/мл гаретосмаба, который будет использоваться для IV введения. Виды деятельности по разработке состава в случае жидкого состава включали оценку концентрации гистидинового буфера, концентрации поверхностно-активного вещества и других стабилизаторов.

Выбор буфера и уровня pH для жидкого состава на основе гаретосмаба

В ходе изначальной деятельности по разработке для FII было определено, что оптимальный уровень pH для гаретосмаба составлял 6,3. Уровень pH оставался неизменным на протяжении всей разработки. В первичных исследованиях 1 фазы гаретосмаба для лиофилизированного состава использовали гистидиновый буфер, исходя из исследования по скринингу буферов. Аналогичный буфер был выбран для поздней стадии разработки состава. Стабильность 50 мг/мл гаретосмаба тестировали в рамках инкубации при 45 °C в течение 28 суток при уровне pH 6,3, с концентрацией гистидина 5 мМ, 10 мМ или 25 мМ, для оценки оптимальной концентрации гистидина. Результаты этого стресс-теста показали, что 10 мМ гистидин при уровне pH 6,3 попадает в стабильную область проектного поля, с достаточным пространством на каждом конце для допущения небольших вариаций концентрации буфера (таблица 10) или уровня pH (таблица 4). Исходя из этих результатов, аналогичная композиция буфера и уровень pH, используемые для лиофилизированного состава, гистидин в концентрации 10 мМ и уровень pH 6,3, были выбраны в качестве буфера, концентрации буфера и уровня pH для поздней стадии разработки жидкого состава.

Выбор термостабилизаторов для жидкого состава на основе гаретосмаба

В первичных исследованиях по разработке гаретосмаба было продемонстрировано, что для стабилизации гаретосмаба в отношении стресса в виде замораживания-размораживания требовалась 5% (мас./об.) сахароза. Следовательно, к нерасфасованной лекарственной субстанции (DS) добавляли 5% (мас./об.) сахарозы, поскольку она обеспечивает адекватную стабилизацию нерасфасованной DS в отношении образования НМВ-соединений при подвергании циклам замораживания и размораживания, которым подвергалась бы DS в процессе производства (стабильность DS в отношении замораживания и размораживания обсуждается в секции S.7.1). Исследование проводили для оценки стабильности 50 мг/мл жидкого гаретосмаба при инкубировании при 45 °C в течение 28 суток или при подвергании 8 циклам замораживания и размораживания, при этом концентрация сахарозы в составе варьировалась в диапазоне от 0 до 10%. Результаты этих стресс-тестов показывают, что 5% сахароза попадает в стабильную область проектного поля, с достаточным пространством на каждом конце для допущения небольших вариаций концентрации сахарозы, которые могут возникать в результате обычной изменчивости производственного процесса (таблица 11 и таблица 12). В качестве стабилизатора была выбрана 5% сахароза, поскольку она обеспечивает достаточную стабилизацию гаретосмаба в отношении термического стресса и замораживания и размораживания и обеспечивает приемлемую осмоляльность в конечном составе.

Аргинин оценивали как дополнительный стабилизатор для жидкого состава на основе гаретосмаба. В ходе анализа оценивали диапазон концентраций аргинина от 0 до 100 мМ (таблица 13). Результаты стресс-теста показывают, что 70 мМ аргинин попадает в стабильную область проектного поля, с достаточным пространством на каждом конце для допущения небольших вариаций концентрации аргинина, которые могут возникать в результате обычной изменчивости производственного процесса (таблица 13). В качестве стабилизатора в жидком составе на основе гаретосмаба был выбран аргинин 70 мМ в связи со сниженной степенью образования НМВ-соединений и кислотных вариантов, отличающихся зарядом, наблюдаемой при проверке стабильности в стрессовых условиях, и поскольку он обеспечивает приемлемую осмоляльность в конечном составе.

Выбор поверхностно-активного вещества для жидкого состава на основе гаретосмаба

В 1 фазе для состава на основе гаретосмаба был выбран 0,1% (мас./об.) полисорбат 80. Результаты дополнительного тестирования, в котором сравнивали стабильность 50 мг/мл гаретосмаба в присутствии полисорбата 20 или полисорбата 80, показали, что оба поверхностно-активных вещества обеспечивали сопоставимую стабильность 50 мг/мл гаретосмаба при инкубации при 45 °C в течение 28 суток или при 25 °C в течение 6 месяцев (таблица 14). Для дальнейшей разработки жидкого состава на основе гаретосмаба был выбран полисорбат 20. Стабильность 50 мг/мл гаретосмаба оценивали при перемешивании в течение 30 минут или инкубации при 45 °C в течение 28 суток при различных концентрациях полисорбата 20. Результаты стресс-теста показывают, что 0,05% полисорбат

20 попадает в стабильную область проектного поля, с достаточным пространством на каждом конце для допущения небольших вариаций концентрации полисорбата 20, которые могут возникать в результате обычной изменчивости производственного процесса (таблица 15 и таблица 16). Для жидкого состава на основе гаретосмаба была выбрана концентрация полисорбата 20 0,05% (мас./об.).

Выводы

Результаты исследований, в которых тестировали стабильность гаретосмаба, когда составы подвергали стрессовым условиям, инкубации при 45 °C, перемешиванию на вортексе и циклам замораживания/размораживания, использовали для отбора состава для поздней стадии разработки. Исходя из данных, собранных в результате этих исследований, был выбран состав на основе гаретосмаба, содержащий 10 мМ гистидина, уровень pH 6,3, 5% сахарозы, 70 мМ аргинина-HCl и 0,05% полисорбата 20, и впоследствии было продемонстрировано, что он является подходящим для клинического или коммерческого применения. Концентрации вспомогательных веществ были выбраны таким образом, чтобы небольшие вариации, которые могут возникнуть в процессе стандартного производства, не оказывали заметного влияния на стабильность или качество DP на основе гаретосмаба. Выбранный состав содержит 60 мг/мл гаретосмаба для обеспечения дозы 300 мг в извлекаемом объеме 5 мл. Пригодность этого состава была подтверждена данными по долгосрочной стабильности в ходе разработки при хранении в течение 18 месяцев при 5 °C, данными по стабильности при воздействии режима ускоренного старения при хранении в течение 6 месяцев при 25 °C/60% RH и данными тестирования стабильности при воздействии стрессовых условий, включая данные по стабильности при хранении в течение 56 суток при 40 °C/75% RH, воздействии 8 циклов замораживания и размораживания и 120 минут перемешивания (вортекс).

Таблица 10. Эффект концентрации гистидина в отношении стабильности 50 мг/мл гаретосмаба, инкубированного при 45 °С в течение 28 суток.

Состав		50 мг/мл гаретосмаб, уровень pH 6,3									
Объем наполнения		0,3 мл									
Контейнер/упковка		Флаккон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутилкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®									
Концентрация гистидина	Номер партии	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	Уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC ^a			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC ^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
5 mM	L16-1298	Проверка пройдена	0,01	6,4	104	3,2	-3,7	0,5	13,5	-15,2	1,7
10 mM	L16-1299	Проверка пройдена	0,01	6,4	103	2,9	-3,5	0,6	13,5	-14,6	1,2

25 мМ	L16- 1300	Проверк а пройдена	0,01	6,4	103	2,6	-3,2	0,6	13,5	-14,6	1,1
-------	--------------	--------------------------	------	-----	-----	-----	------	-----	------	-------	-----

^a Регистировалось как изменение чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,6\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 50,3\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах. Отрицательные числа указывают на снижение измеренной характеристики, а положительные числа указывают на ее повышение.

Таблица 11. Эффект концентрации сахарозы в отношении стабильности 50 мг/мл гаретосмаба, инкубированного при 45 °С в течение 28 суток.

Состав		50 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,3									
Объем наполнения		0,3 мл									
Контейнер/укупорка		Флаккон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутилкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®									
Концентрация сахарозы	Номер партии	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	Уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC ¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC ^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
0%	L16-1306	Проверка пройдена	0,00	6,4	100	3,0	-3,5	0,5	13,2	-14,0	0,8
2,5%	L16-1307	Проверка пройдена	0,00	6,4	102	2,7	-3,2	0,6	13,0	-13,4	0,4

5%	L16-1308	Проверка пройдена	0,00	6,3	101	2,5	-3,0	0,5	13,2	-13,9	0,7
7,5%	L16-1309	Проверка пройдена	0,00	6,3	101	2,5	-3,0	0,5	13,9	-14,5	0,6
10%	L16-1310	Проверка пройдена	0,00	6,3	102	2,2	-2,8	0,6	13,2	-14,7	1,5

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 50,2\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах. Отрицательные числа указывают на снижение измеренной характеристики, а положительные числа указывают на ее повышение.

Таблица 12. Эффект концентрации сахарозы в отношении стабильности 50 мг/мл гаретосмаба после 8 циклов замораживания и размораживания.

Состав		50 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,3									
Объем наполнения		0,3 мл									
Контейнер/укупорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®									
Концентрация сахарозы	Номер партии	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	Уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC ¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC ^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
0%	L16-1306	Проверка пройдена	0,00	6,3	98	0,7	-0,9	0,2	-0,7	0,7	0,0
2,5%	L16-1307	Проверка пройдена	0,00	6,3	98	0,1	-0,3	0,2	-0,5	0,5	0,0
5%	L16-1308	Проверка пройдена	0,00	6,3	98	0,1	-0,2	0,2	-0,6	0,0	0,5

7,5%	L16-1309	Проверка пройдена	0,00	6,3	98	0,0	-0,2	0,2	-0,6	0,5	0,1
10%	L16-1310	Проверка пройдена	0,00	6,3	98	0,1	-0,2	0,2	-0,6	0,1	0,5

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 50,2\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах. Отрицательные числа указывают на снижение измеренной характеристики, а положительные числа указывают на ее повышение.

Таблица 13. Эффект концентрации аргинина в отношении стабильности 50 мг/мл гаретосмаба, инкубированного при 45 °С в течение 28 суток.

Состав		50 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,3									
Объем наполнения		0,3 мл									
Контейнер/укупорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®									
Концентрация аргинина	Номер партии	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	Уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC ¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC ^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
0 мМ	L16-1403	Проверка пройдена	0,00	6,4	102	3,0	-3,6	0,6	13,2	-14,4	1,2
25 мМ	L16-1311	Проверка пройдена	0,00	6,4	102	2,3	-2,9	0,6	11,1	-12,5	1,5
50 мМ	L16-1312	Проверка пройдена	0,00	6,4	100	2,3	-2,9	0,6	10,6	-13,7	3,1

70 мМ	L16-1313	Проверка пройдена	0,00	6,3	99	2,2	-2,8	0,6	10,3	-12,9	2,6
100 мМ	L16-1314	Проверка пройдена	0,00	6,4	98	2,3	-3,0	0,7	9,7	-11,5	1,8

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 50,3\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах. Отрицательные числа указывают на снижение измеренной характеристики, а положительные числа указывают на ее повышение.

Таблица 14. Стабильность жидкого состава на основе 50 мг/мл гаретосмаба в присутствии 0,05% полисорбата 20 или 0,05% полисорбата 80, инкубированного при 45 °С в течение 28 суток или 25 °С в течение 6 месяцев.

Состав		50 мг/мл гаретосмаба, 10 мМ гистидина, уровень pH 6,3, 5% сахарозы, 70 мМ аргинина									
Объем наполнения		0,5 мл									
Контейнер/укупорка		Флакон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутылкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®									
Состав	Номер партии	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	Уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC ¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC ^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
45 °С, 0,05% полисорбат 20, 28 суток	L13-883	Проверка пройдена	0,01	6,4	104	2,2	-2,9	0,6	7,0	-10,6	3,6

45 °С, 0,05% полисорбат 80, 28 суток	L13- 884	Проверк а пройден а	0,01	6,4	104	2,1	-2,7	0,6	9,5	-13,6	4,1
25 °С, 0,05% полисорбат 20, 6 месяцев	L13- 883	Проверк а пройден а	0,01	6,4	102	0,1	-0,4	0,3	2,8	-8,2	5,4
25 °С, 0,05% полисорбат 80, 6 месяцев	L13- 884	Проверк а пройден а	0,01	6,4	103	0,2	-0,1	-0,1	3,7	-10,2	6,5

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,9\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 55,5\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах. Отрицательные числа указывают на снижение измеренной характеристики, а положительные числа указывают на ее повышение.

Таблица 15. Эффект концентрации полисорбата 20 в отношении стабильности 50 мг/мл гаретосмаба после перемешивания в течение 30 минут.

Состав		50 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,3, х% полисорбат 20									
Объем наполнения		0,5 мл									
Контейнер/упковка		Флаккон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутилкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®									
Концентрация полисорбата 20	Номер партии	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	Уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC ¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC ^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
0,025%	L16-1302	Проверка пройдена	0,00	6,3	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	-0,5
0,05%	L16-1303	Проверка пройдена	0,00	6,3	100	0,0	-0,1	0,0	0,1	0,2	-0,3

0,075%	L16-1304	Проверка пройдена	0,00	6,3	100	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,2	0,3
0,1%	L16-1305	Проверка пройдена	0,00	6,4	100	0,0	-0,1	0,1	0,0	0,0	0,0

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 50,1\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах. Отрицательные числа указывают на снижение измеренной характеристики, а положительные числа указывают на ее повышение.

Таблица 16. Эффект концентрации полисорбата 20 в отношении стабильности 50 мг/мл гаретосмаба, инкубированного при 45 °С в течение 28 суток.

Состав		50 мг/мл гаретосмаб, 10 мМ гистидин, уровень pH 6,3, х% полисорбат 20									
Объем наполнения		0,5 мл									
Контейнер/упковка		Флаккон из боросиликатного стекла 1 типа на 2 мл с бутилкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®									
Концентрация полисорбата 20	Номер партии	Цвет и внешний вид	Мутность (повышение OD при 405 нм)	Уровень pH	% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC	Изменение чистоты, измеренное с помощью SE-UPLC ¹⁾			Изменение в отношении вариантов, отличающихся зарядом, измеренное с помощью CEX-UPLC ^a		
						% HMW	% Нативного	% LMW	% Кислотного	% Главного	% Основного
0,025%	L16-1302	Проверка пройдена	0,01	6,4	103	3,2	-3,8	0,6	13,7	-14,7	1,0
0,05%	L16-1303	Проверка пройдена	0,01	6,4	104	3,1	-3,7	0,6	13,5	-13,9	0,4

0,075%	L16-1304	Проверка пройдена	0,01	6,4	103	3,1	-3,6	0,6	13,2	-13,7	0,4
0,1%	L16-1305	Проверка пройдена	0,01	6,4	103	3,1	-3,7	0,6	13,6	-15,8	2,2

^a Регистрировалось как изменение чистоты относительно исходного материала. Исходный материал (без инкубации) содержит $\geq 98,8\%$ пика нативного белка, определяемого с помощью SE-UPLC, и $\geq 50,1\%$ пика главного компонента, определяемого с помощью CEX-UPLC, во всех составах. Отрицательные числа указывают на снижение измеренной характеристики, а положительные числа указывают на ее повышение.

Пример 3. Исследования по стабильности

[00117] Пригодность жидкого состава на основе гаретосмаба, разработанного и предназначенного для поздней стадии клинической разработки и коммерческого применения, была подтверждена с помощью исследований по долгосрочной стабильности, стабильности при воздействии режима ускоренного старения и стрессовых условий. Кроме того, устойчивость коммерческого состава была подтверждена с использованием подхода на основе планирования эксперимента (DOE).

[00118] Были инициированы исследования для оценки стабильности при хранении, воздействии режима ускоренного старения и стрессовых условий исследуемой партии DP на основе гаретосмаба. Партия FDS, используемая для таких исследований, представляет собой репрезентативный FDS, изготовленный для клинического применения. Конфигурация DP, используемая в этих исследованиях, была идентична конфигурации DP, используемой в клинических исследованиях 2 фазы, и она была получена путем наполнения 5,5 мл FDS в стеклянные флаконы 1 типа на 10 мл.

Изучение стабильности при хранении, воздействии режима ускоренного старения и стрессовых условий для лекарственного препарата на основе гаретосмаба

[00119] DP на основе гаретосмаба был физически и химически стабильным в случае хранения при 2-8 °C в течение по меньшей мере 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев (таблица 17).

[00120] В отношении отслеживаемых характеристик не было выявлено никаких заметных изменений. Результаты анализа DP на основе гаретосмаба после инкубации в стрессовых условиях и с использованием режима ускоренного старения при повышенных температурах представлены в таблице 18. После инкубации в течение 56 суток при 40 °C/75% RH было выявлено некоторое образование HMW-соединений, LMW-соединений и вариантов, отличающихся зарядом (увеличенная относительная процентная доля кислотных соединений (область 1)). После инкубации при 25 °C/60% RH в течение 6 месяцев, по результатам SE-UPLC не наблюдали какого-либо повышения содержания HMW-соединений, однако при этом наблюдали некоторое повышение содержания кислотных соединений (область 1) по результатам CEX-UPLC и icIEF. Кроме того, небольшое повышение содержания LMW-соединений наблюдали по результатам MCE в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, соответственно, после инкубации в течение 6 месяцев при 25 °C/60%RH. В отношении других отслеживаемых характеристик не наблюдали никаких существенных изменений. Жидкий DP будет подвергаться воздействию условий комнатной температуры только в течение коротких периодов времени. Значения температуры выше комнатной температуры будут избегаться.

[00121] Результаты анализа DP на основе гаретосмаба после того, как он был подвергнут перемешиванию или нескольким циклам замораживания и размораживания, показаны в таблице 19. В случае, когда DP на основе гаретосмаба подвергали перемешиванию в течение 120 минут или 8 циклам замораживания и размораживания, в отношении отслеживаемых характеристик не наблюдали никаких существенных

изменений. Результаты по стабильности в ходе исследования подтвердили, что состав на основе гаретосмаба, разработанный для коммерческого применения, является подходящим и обеспечивает стабильность лекарственного препарата.

Таблица 17. Стабильность в ходе исследования жидкого лекарственного препарата на основе гаретосмаба, хранящегося при 2-8 °С

Состав		60 мг/мл гаретосмаба, 10 мМ гистидина, уровень pH 6,3, 70 мМ аргинина-HCl, 5% сахарозы, 0,05% полисорбата 20								
Объем наполнения		5,5 мл								
Контейнер/упаковка		Флаконы из боросиликатного стекла 1 типа на 10 мл с пробкой West S10-F451W 4432/50 GRY B2-40								
		Продолжительность хранения при 2-8 °С (месяцы)								
Анализ		0	1	2	3	6	9	12	18	24
Цвет и внешний вид		Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка
Мутность (повышение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Уровень pH		6,3	6,3	6,3	6,4	6,3	6,3	6,4	6,3	6,4
Грануломет	≥ 10 мкм	33	N R	N R	N R	11	N R	61	28	28

рический анализ с помощью HPLC (частиц на контейнер)	≥ 25 мкм	0	N R	N R	N R	0	N R	0	0	0
Гранулометрический анализ с помощью MFI (частиц на мл)	2-10 мкм	59	N R	N R	N R	94 0	N R	23 03	1664	2934
	≥ 10 мкм	5	N R	N R	N R	12	N R	9	4	3
	≥ 25 мкм	1	N R	N R	N R	3	N R	3	2	2
% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC		10 0	10 1	10 6	10 1	10 1	96	10 0	98	100
МСЕ в невосстановительных условиях	% Чистоты пика главного компонента	96 ,6	N R	N R	N R	96, 1	N R	96, 7	96,1	96,5
	% LMW-соединений	3, 0	N R	N R	N R	3,4	N R	3,2	3,5	3,1

ях	% HMW-соединений	0,5	N R	N R	N R	0,5	N R	0,2	0,5	0,4
МСЕ в восстанавливающих условиях	% Чистоты	94,7	N R	N R	N R	94,6	N R	95,0	94,2	94,5
	% LMW-соединений	1,9	N R	N R	N R	2,1	N R	1,8	2,5	2,0
	% NGHC	1,5	N R	N R	N R	1,5	N R	1,5	1,7	1,5
Чистота, измеренная с помощью SE-UPLC	% HMW-соединений	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
	% Чистоты пика главного компонента	98,7	98,6	98,8	98,8	98,2	98,6	98,4	98,1	98,1
	% LMW-соединений	0,5	0,7	0,5	0,5	1,1	0,7	0,9	1,2	1,2
Анализ вариантов, отличающихся зарядом, с помощью CEХ-UPLC	% Области 1	24,1	24,2	24,1	23,7	24,4	24,6	22,4	24,4	24,6
	% Области 2	55,6	57,5	57,7	58,2	57,5	58,1	57,9	56,9	57,5
	% Области 3	20,3	18,3	18,2	18,2	18,1	17,4	19,7	18,7	17,9

Анали- з вариан- тов, отлича- ющихся зарядо- м, с помощ- ью iCIEF	% Области 1	40 ,6	N R	N R	N R	40, 9	N R	40, 0	40,6	42,4
	% Области 2	52 ,8	N R	N R	N R	52, 3	N R	52, 7	52,1	51,3
	% Области 3	6, 6	N R	N R	N R	6,9	N R	7,3	7,3	6,3
% Относительной активности, измеренный помощью биологического анализа		11 1	N R	N R	N R	11 0	N R	10 6	95	99

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; iCIEF, изоэлектрическое фокусирование с постоянным детектированием по всей длине капилляра; LMW, низкая молекулярная масса; MCE, капиллярный электрофорез на микрочипе; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, не требуется; OD, оптическая плотность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Таблица 18. Стабильность в ходе исследования жидкого лекарственного препарата на основе гаретосмаба, хранящегося в режиме ускоренного старения.

Состав		60 мг/мл гаретосмаба, 10 мМ гистидина, уровень pH 6,3, 70 мМ аргинина-HCl, 5% сахарозы, 0,05% полисорбата 20								
Объем наполнения		5,5 мл								
Контейнер/укупорка		Флаконы из боросиликатного стекла 1 типа на 10 мл с пробкой West S10-F451W 4432/50 GRY B2-40								
		Без хранения	Хранение при 25°C/60% RH (месяцы)				Хранение при 40°C/75% RH (сутки)			
Анализ		T=0	1	2	3	6	7	14	28	56
Цвет и внешний вид		Проверка пройдена	Проверка пройдена	Проверка пройдена	Проверка пройдена	Проверка пройдена	Проверка пройдена	Проверка пройдена	Проверка пройдена	Проверка пройдена
Мутность (повышение OD при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
Уровень pH		6,3	6,4	6,3	6,4	6,3	6,3	6,4	6,4	6,3
Гранулометрический анализ с помощью НІАС (частиц на контейн	≥ 10 мкм	33	NR	NR	28	6	NR	NR	6	61
	≥ 25 мкм	0	NR	NR	0	0	NR	NR	0	0

ер)										
Гранулометрический анализ с помощью MFI (частиц на мл)	2-10 мкм	59	NR	NR	774	1468	NR	NR	641	308
	≥ 10 мкм	5	NR	NR	7	10	NR	NR	19	9
	≥ 25 мкм	1	NR	NR	3	1	NR	NR	5	1
% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC		100	102	106	101	102	101	101	101	102
MCE в невосстановивающих условиях	% Чистоты пика главног окомпонента	96,6	NR	NR	96,3	95,2	NR	NR	95,6	93,7

	ен та									
	% L M W- сое ди не ни й	3,0	NR	NR	3,3	4,3	NR	NR	3,9	5,6
	% H M W- сое ди не ни й	0,5	NR	NR	0,4	0,5	NR	NR	0,6	0,7
МСЕ в восстан авливаю щих условия х	% Чи сто ты	94,7	NR	NR	93,4	92, 3	NR	NR	93,6	91,5
	% L M W- сое ди не	1,9	NR	NR	2,9	4,0	NR	NR	2,9	4,6

	ни й									
	% N G HC	1,5	NR	NR	1,5	1,6	NR	NR	1,6	1,7
Чистота , измерен ная с помощь ю SE- UPLC	% H M W- сое ди не ни й	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	1,1	1,6
	% Чи сто ты пи ка гла вн ог о ко мп он ен та	98,7	98,6	98,6	98,6	98, 1	98,6	98,5	98,2	97,5
	% L M	0,5	0,7	0,7	0,6	1,1	0,6	0,7	0,8	0,9

	W- сое ди не ни й									
Анализ вариант ов, отличаю щихся зарядом , с помощь ю CEX- UPLC	% Об лас ти 1	24,1	24,4	25,2	25,8	29, 6	24,3	26,1	30,6	39,1
	% Об лас ти 2	55,6	57,3	56,9	56,6	53, 3	58,0	56,6	52,1	45,1
	% Об лас ти 3	20,3	18,3	17,9	17,5	17, 1	17,7	17,3	17,3	15,7
Анализ вариант ов, отличаю щихся зарядом , с помощь ю iCIEF	% Об лас ти 1	40,6	NR	NR	44,4	48, 9	NR	44,4	51,6	60,0
	% Об лас ти 2	52,8	NR	NR	48,1	45, 2	NR	48,8	42,6	34,5

	% Об- лас- ти 3	6,6	NR	NR	7,6	6,0	NR	6,8	5,7	5,5
--	-----------------------------	-----	----	----	-----	-----	----	-----	-----	-----

СЕХ, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; iCIEF, изоэлектрическое фокусирование с постоянным детектированием по всей длине капилляра; LMW, низкая молекулярная масса; MCE, капиллярный электрофорез на микрочипе; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, не требуется; OD, оптическая плотность; RH, относительная влажность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Таблица 19. Стабильность в ходе исследования жидкого лекарственного препарата на основе гаретосмаба при воздействии стрессовых условий в виде перемешивания и замораживания и размораживания.

Состав	60 мг/мл гаретосмаба, 10 мМ гистидина, уровень pH 6,3, 70 мМ аргинина-HCl, 5% сахарозы, 0,05% полисорбата 20					
Объем наполнения	5,5 мл					
Контейнер/упаковка	Флаконы из боросиликатного стекла 1 типа на 10 мл с пробкой West S10-F451W 4432/50 GRY B2-40					
	Без хранения	Перемешивание с помощью вортекса (минуты)			№ циклов замораживания и размораживания	
Анализ	T=0	30	60	120	4	8
Цвет и внешний вид	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка	Проведена проверка
Мутность (повышение OD при 405 нм)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Уровень pH		6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
Гранулометрический анализ с помощью НІАС (частиц на контейнер)	≥ 10 мкм	33	NR	NR	66	NR	77
	≥ 25 мкм	0	NR	NR	11	NR	6
Гранулометрический анализ с помощью MFI (частиц на мл)	2-10 мкм	59	NR	NR	1362	NR	695
	≥ 10 мкм	5	NR	NR	13	NR	10
	≥ 25 мкм	1	NR	NR	3	NR	3
% Общего белка, извлеченного с помощью RP-UPLC		100	101	101	100	101	103
MCE в невосстанавливающих условиях	% Чистоты пика главного компонента	96,6	NR	NR	96,5	NR	96,7
	% LMW-соединений	3,0	NR	NR	3,1	NR	2,9
	% HMW-соединений	0,5	NR	NR	0,4	NR	0,5
MCE в	% Чистоты	94,7	NR	NR	94,8	NR	95,3

восстан авливаю щих условия х	% LMW- соединений	1,9	NR	NR	1,9	NR	1,6
	% NGHC	1,5	NR	NR	1,6	NR	1,4
Чистота, измерен ная с помощь ю SE- UPLC	% HMW- соединений	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8
	% Чистоты пика главного компонента	98,7	98,7	98,6	98,6	98,7	98,6
	% LMW- соединений	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Анализ вариант ов, отличаю щихся зарядом, с помощь ю CEX- UPLC	% Области 1	24,1	24,2	23,3	24,2	23,6	23,6
	% Области 2	55,6	55,7	56,4	55,5	58,5	58,6
	% Области 3	20,3	20,1	20,3	20,3	17,9	17,8
Анализ вариант ов, отличаю щихся зарядом, с помощь ю iCIEF	% Области 1	40,6	NR	NR	42,1	NR	40,7
	% Области 2	52,8	NR	NR	51,2	NR	51,4
	% Области 3	6,6	NR	NR	6,7	NR	7,9

CEX, катионообменная; DS, лекарственная субстанция; FDG, группа по разработке состава; HMW, высокая молекулярная масса; iCIEF, изоэлектрическое фокусирование с постоянным детектированием по всей длине капилляра; LMW, низкая молекулярная масса; MCE, капиллярный электрофорез на микрочипе; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, не требуется; OD, оптическая плотность; RH, относительная влажность; RP, обращенно-фазовая; SE, эксклюзионная; UPLC, сверхпроизводительная жидкостная хроматография

Выводы

[00122] Результаты исследований по стабильности при долгосрочном хранении, при воздействии режима ускоренного старения и стрессовых условий DP на основе гаретосмаба являются обоснованием клинического применения данного продукта. DP на основе гаретосмаба может выдерживать кратковременное воздействие комнатной температуры без ущерба для физической или химической стабильности. DP на основе гаретосмаба будет храниться при 2 °C-8 °C, а воздействие температур, превышающих 2 °C-8 °C, будет ограничиваться.

Пример 4. Исследования по устойчивости

[00123] В процессе производства могут возникать нормальные изменения композиции DP на основе гаретосмаба, включая вариации концентрации гаретосмаба, концентрации вспомогательных веществ (гистидина, аргинина, сахарозы или полисорбата 20) и/или уровня pH состава. Поскольку вариации в отношении любого из таких влияющих на состав факторов могут потенциально повлиять на стабильность или качество DP, были проведены исследования устойчивости состава для оценки влияния таких вариаций в определенных диапазонах.

[00124] Для оценки эффекта каждого отдельного влияющего на состав фактора, а также влияния взаимодействий между факторами на стабильность состава, были использованы два DOE-исследования:

[00125] Предварительное исследование устойчивости - DOE-исследование с оценкой стабильности при воздействии режима ускоренного старения и стрессовых условий с целью идентификации ключевых влияющих на состав факторов, которые могут повлиять на стабильность DP на основе гаретосмаба.

[00126] Окончательное исследование устойчивости - всестороннее DOE-исследование, в котором оценивают ключевые влияющие на состав факторы, идентифицированные в предварительном исследовании устойчивости, с тестированием стабильности в течение срока хранения при воздействии стрессовых условий, режима ускоренного старения и при долгосрочном хранении для оценки устойчивости состава на основе гаретосмаба.

[00127] Номинальная композиция коммерческого состава на основе гаретосмаба состоит из

60 мг/мл гаретосмаба, 10 mM гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, 70 mM аргинина-HCl, 0,05% (мас./об.) полисорбата 20, с уровнем pH 6,3.

[00128] Целью этого предварительного исследования устойчивости было изучение основных эффектов и объединенных эффектов нескольких факторов (взаимодействия и квадратичные эффекты) в отношении стабильности гаретосмаба и идентификация факторов, которые должны быть включены во всестороннее исследование устойчивости (основные эффекты представляют собой влияющие на состав факторы, взаимодействия описывают взаимодействия между двумя разными факторами и квадратичные эффекты описывают взаимодействия, при которых фактор взаимодействует сам с собой). В этом исследовании изучали все основные эффекты. Подлежащее изучению подмножество взаимодействий и квадратичных эффектов было выбрано на основе оценки риска, исходя из предшествующих опытных данных по гаретосмабу. На основе оценки риска было разработано 6-факторное D-оптимальное DOE-исследование для определения характеристик и изучения проектного поля для вспомогательного вещества. Было разработано исследование с 24 образцами, в котором учитывались основные эффекты и взаимодействия и квадратичные эффекты, которые были определены при оценке риска. Дизайн был создан, оценен и подтвержден в JMP12.1 с обеспечением надлежащей статистической мощности и возможностью покрытия проектного поля с хорошей возможностью оценки. Дизайн предварительного исследования устойчивости описан в таблице 20, таблице 21 и таблице 22.

Таблица 20. Факторы, тестируемые в предварительном исследовании устойчивости гаретосмаба.

Влияющий на состав фактор	Целевой уровень	Тестируемый диапазон	Изменение относительно целевого уровня
Концентрация гаретосмаба	60 мг/мл	54-66 мг/мл	± 10%
Концентрация сахарозы	5%	4-6%	± 20%
Концентрация аргинина	70 mM	56-84 mM	± 20%
Концентрация гистидина	10 mM	8-12 mM	± 20%
Уровень pH	6,3	6,0-6,6	± 0,3 единиц pH
Концентрация полисорбата 20	0,05%	0,025-0,075%	± 50%

Таблица 21. Составы, оцениваемые в предварительном исследовании устойчивости гаретосмаба.

№ состав а	№ парти и	Белок , мг/мл	Гистид ин, мМ	Урове нь рН	Сахаро за, % (мас./об)	Аргин ин, мМ	Полисор бат 20, % (мас./об.)
F1	L18- 2712	66	8	6,6	6	56	0,025
F2	L18- 2713	54	8	6,6	6	84	0,075
F3	L18- 2714	66	10	6,6	6	70	0,075
F4	L18- 2715	54	8	6,0	4	84	0,025
F5	L18- 2716	54	10	6,6	4	84	0,025
F6	L18- 2717	66	8	6,0	6	84	0,075
F7	L18- 2718	66	12	6,6	4	56	0,075
F8	L18- 2719	66	8	6,6	4	84	0,025
F9	L18- 2720	66	8	6,0	4	56	0,075
F10	L18- 2721	54	12	6,3	4	84	0,025
F11	L18- 2722	54	10	6,3	6	56	0,075
F12	L18- 2723	66	10	6,0	4	70	0,025

F13	L18-2724	54	8	6,6	4	56	0,075
F14	L18-2725	54	12	6,6	4	70	0,075
F15	L18-2726	66	12	6,6	6	84	0,075
F16	L18-2727	54	12	6,0	6	84	0,075
F17	L18-2728	54	12	6,6	6	56	0,025
F18	L18-2729	54	12	6,0	4	56	0,075
F19	L18-2730	66	8	6,3	4	70	0,075
F20	L18-2731	66	12	6,0	4	84	0,025
F21	L18-2732	54	8	6,0	6	56	0,025
F22	L18-2733	54	8	6,0	6	70	0,025
F23	L18-2734	66	12	6,0	6	56	0,025
F24	L18-2735	66	12	6,3	6	70	0,025

Таблица 22. Условия хранения и интервалы отбора образцов для предварительного исследования устойчивости гаретосмаба.

Температура инкубации	Интервалы отбора образцов
25 °C	1, 3, 6 месяцев

45 °C	7, 14, 21, 28 суток
t=0	0 (сутки)

Результаты

[00129] В предварительном исследовании устойчивости гаретосмаба стабильность гаретосмаба в зависимости от изменения состава оценивали как при 25 °C, так и при 45 °C. Однако факторы, выбранные для окончательного исследования устойчивости, основывались на показателях скорости деградации, определенных только при 45°C. Если скорость изменения ответа характеризовалась $p \leq 0,05$ для конкретного фактора (включая основные эффекты, взаимодействия и квадратичные эффекты), такой фактор считался статистически значимым и таковым, который будет рассмотрен для окончательного исследования устойчивости. В таблице 23 показан краткий обзор результатов DOE-анализа, показывающего статистически значимые ответы и ассоциированные переменные. Ответы, изучаемые в DOE-анализе, представляли собой скорость изменения в сутки в отношении NMW, LMW и мономера по результатам SE-UPLC и скорость изменения в сутки в отношении кислотных соединений, пика главного компонента и основных соединений по результатам CEX-UPLC и icIEF. Другие ответы, включая внешний вид, мутность по OD при 405 нМ, уровень pH, концентрацию белка (извлечение) и невидимые невооруженным глазом частицы по результатам MFI, измеряли, но рассматривали их в контексте прохождения/не прохождения проверки или для информации и не использовали в DOE-анализе.

Таблица 23. Статистически значимые ответы, ассоциированные факторы, показатели скорости и Р-значения. Жирным шрифтом выделены статистически значимые переменные эффектов, не являющихся основными, исходя из результатов тестирования стабильности при 45 °C.

Ответ	Переменная	Влияние на скорость в сутки ^a	р-значение ^b
Скорость изменения для кислотных соединений при 45 °C в сутки	уровень pH	0,116	0,000
Скорость изменения для главного компонента при 45 °C в сутки	уровень pH	-0,079	0,000

Скорость изменения для основных соединений при 45 °С в сутки	уровень pH	-0,037	0,000
Скорость изменения для основных соединений при 45 °С в сутки, icIEF	уровень pH	-0,025	0,002
Скорость изменения для кислотных соединений при 45 °С в сутки	Гистидин*pH	0,015	0,003
Скорость изменения для мономера при 45 °С в сутки	Сахароза	0,005	0,003
Скорость изменения для НМW-соединений при 45 °С в сутки	Гаретосмаб	0,004	0,004
Скорость изменения для НМW-соединений при 45 °С в сутки	Сахароза	-0,004	0,004
Скорость изменения для мономера при 45 °С в сутки	Гаретосмаб	-0,004	0,004
Скорость изменения для НМW-соединений при 45 °С в сутки	уровень pH	-0,004	0,004
Скорость изменения для мономера при 45 °С в сутки	уровень pH	0,004	0,009

Скорость изменения для кислотных соединений при 45 °C в сутки	Гаретосмаб*рН	-0,010	0,011
Скорость изменения для кислотных соединений при 45 °C в сутки, icIEF	уровень рН	0,055	0,018
Скорость изменения для основных соединений при 45 °C в сутки, icIEF	Гистидин*гистидин	-0,033	0,025
Скорость изменения для кислотных соединений при 45 °C в сутки	Аргинин	-0,008	0,031
Скорость изменения для мономера при 45 °C в сутки	Аргинин	-0,003	0,037
Скорость изменения для основных соединений при 45 °C в сутки, icIEF	Аргинин*аргинин	0,026	0,041

^a Показатели скорости получены на основе взвешенных оценочных значений, регистрируемых в JMP. Регистрируемые показатели скорости в 2 раза превышают оценочные значения, поскольку оценочные значения являются половинными оценочными значениями.

^b р-значения $\leq 0,05$ в данном исследовании соответствуют статистической значимости.

[00130] Результаты по визуальной проверке, мутности по OD при 405 нм, уровню рН, извлечению белка и невидимым невооруженным глазом частицам, измеряемым с помощью MFI, были следующими: все образцы прошли визуальную проверку; ни для одного из образцов не наблюдали существенных повышений OD при 405 нм; никаких

изменений концентраций белка не наблюдали. Все измерения концентрации находились в пределах 5% значений $t=0$; и наблюдались некоторые колебания концентраций частиц, измеренных с помощью MFI, а также некоторые тенденции к повышению. Некоторые тенденции были статистически значимыми, однако те из них, которые были значимыми, на практике не были существенными.

Выводы

[00131] Результаты DOE-анализа показали, что следующие факторы эффектов, не являющихся основными, оказывали статистически значимый эффект в отношении стабильности гаретосмаба в условиях термического стресса (инкубация при 45 °C в течение 28 суток).

[Гистидин]*pH

[Гаретосмаб]*pH

[Гистидин]*[гистидин]

[Аргинин]*[аргинин]

Эти взаимодействия и квадратичные эффекты были включены в окончательное исследование устойчивости вместе со всеми основными эффектами. Подробный обзор предварительного исследования устойчивости, включая данные по инкубации при 45 °C и 25 °C, обсуждается в отчете EXP-09 Jul 2019-0096 предварительного PAR-исследования гаретосмаба.

Дизайн окончательного исследования устойчивости гаретосмаба

[00132] Диапазоны влияющих на состав факторов, тестируемых в этом исследовании, были определены как более широкие или равные предполагаемым диапазонам, если учитывать как вклад изменчивости производственного процесса, так и изменчивости анализа. Параметры состава в этом исследовании устойчивости включают концентрацию гаретосмаба ($\pm 10\%$, что является допустимым пределом), концентрации буфера и стабилизатора ($\pm 20\%$), концентрация поверхностно-активного вещества ($\pm 50\%$) и уровень pH ($\pm 0,3$ единиц, что является допустимым пределом) (таблица 20).

[00133] В рамках оценки влияния ключевых влияющих на состав факторов, идентифицированных в предварительном исследовании устойчивости, на стабильность состава на основе гаретосмаба при хранении и воздействии стрессовых условий, был создан 6-факторный D-оптимальный DOE-дизайн для определения характеристик и изучения проектного поля для вспомогательного вещества. Было спланировано исследование с 14 образцами (таблица 24), в котором учитывались все основные эффекты и вторичные взаимодействия и квадратичные эффекты, идентифицированные как статистически значимые в предварительном исследовании устойчивости. Дизайн был создан, оценен и подтвержден в JMP12.1 с обеспечением достаточной статистической мощности и возможностью покрытия проектного поля с хорошей возможностью оценки. В дополнение к тестируемым составам, был включен один состав со всеми факторами при номинальных уровнях в качестве контроля, однако он был исключен из DOE-анализа. Стеклообразные флаконы 1 типа на 10 мл были заполнены 5,5 мл состава, что соответствует коммерческой

форме DP. Каждый состав оценивали в отношении стабильности при долгосрочном хранении при 2 °С-8 °С, стабильности при воздействии режима ускоренного старения при 25 °С/60%RH и стрессовых условий; 40 °С/75%RH, и при воздействии стрессовых условий в виде перемешивания и замораживания и размораживания (условия хранения и стрессовые условия представлены в таблице 26).

[00134]

[00135] Все составы были охарактеризованы и оценены в отношении физических и химических свойств и стабильности, включая визуальную проверку, уровень pH, мутность, концентрацию белка и степень извлечения, чистоту в отношении отличающихся молекулярной массой форм (оценки проводили с помощью SE-UPLC и капиллярного электрофореза на микрочипе (MCE)) и вариантов, отличающихся зарядом (оценки проводили с помощью CEX-UPLC и изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра (icIEF)) и гранулометрический анализ невидимых невооруженным глазом частиц (оценки проводили с помощью метода светотени (HAC) и MFI), как представлено в таблице 26.

Таблица 24. Составы, оцениваемые в окончательном исследовании устойчивости гаретосмаба.

№ состава	№ партии	Белок, мг/мл	Гистидин, mM	уровень pH	Сахароза, % (мас./об.)	Аргинин, mM	Полисорбат 20, % (мас./об.)
F1	L18-3972	66	8	6	4	56	0,025
F2	L18-3973	54	12	6	6	56	0,025
F3	L18-3974	66	8	6,6	6	70	0,075
F4	L18-3975	66	10	6	6	84	0,075
F5	L18-3976	54	8	6,6	4	84	0,025

F6	L18-3977	66	12	6	4	56	0,075
F7	L18-3978	54	10	6	4	70	0,025
F8	L18-3979	54	10	6,6	6	56	0,025
F9	L18-3980	54	12	6,6	4	70	0,075
F10	L18-3981	54	8	6	6	56	0,075
F11	L18-3982	66	8	6	6	70	0,025
F12	L18-3983	66	10	6,6	4	56	0,075
F13	L18-3984	54	8	6	4	84	0,075
F14	L18-3985	66	12	6,6	6	84	0,025
F15 ^a	L18-3986	60	10	6,3	5	70	0,050

^a Состав 15 представлял собой контрольный состав, в котором все компоненты были включены в номинальных уровнях коммерческого состава. Этот состав не был включен ни в один из DOE-анализов, но его использовали в качестве относительного показателя стабильности тестируемых составов.

Таблица 25. Условия хранения и интервалы отбора образцов для окончательного исследования устойчивости гаретосмаба.

Условия хранения/стрессовые условия	Интервалы отбора образцов
Перемешивание (вортекс)	30, 60 и 120 минут
Замораживание/размораживание (-30°C)	4х и 8х

5 °C	1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 60 месяцев
25 °C/60%RH	1, 2, 3, 6 месяцев
40 °C/75%RH	0,5, 1 и 2 месяца
T=0	0 (сутки)

Таблица 26. План анализа для гаретосмаба.

Анализ	Моменты времени	Цель
Внешний вид	Все	Изменение цвета, выпадение в осадок, частицы
Мутность, OD при 405 нм		Выпадение в осадок
уровень pH		Изменения уровня pH
RP-HPLC		Концентрация и извлечение белка
SE-HPLC		Химическая стабильность, соединения с высокой и низкой MW
CEX-HPLC		Химическая стабильность, варианты, отличающиеся зарядом, дезамидирование
icIEF	0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 и 60 месяцев при 5 °C	Химическая стабильность, варианты, отличающиеся зарядом, дезамидирование
MCE-SDS (R и NR)	Перемешивание в течение 120 минут	Химическая стабильность, соединения с высокой и низкой MW
MFI	8х замораживание/размораживание	Частицы
НІАС	1, 2 месяца при 40 °C/75%RH	Частицы

	3, 6 месяцев при 25 °C/60%RH	
CAD-UPLC	0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 и 60 месяцев при 5°C	Концентрация полисорбата 20
Биологический анализ		Активность/биологическая активность

Результаты (стрессовая температура 40 °C/75%RH)

[00136] Образцы гаретосмаба в составах, перечисленных в таблице 24, инкубировали при 40 °C/75%RH в течение 2 месяцев. Ответами, которые считались наиболее важными для DOE-анализа, были образование вариантов, отличающихся молекулярной массой, по результатам SE-UPLC и MCE, и образование вариантов, отличающихся зарядом, по результатам CEX-UPLC и icIEF. Дополнительные факторы, включая визуальную проверку, уровень pH, мутность, концентрацию и извлечение белка и уровни размера частиц, измеряли, но рассматривали их в контексте прохождения/не прохождения проверки или для информации и не использовали в DOE-анализе. Факторы, которые приводили к статистически значимым изменениям в отношении измеряемых ответов, перечислены в таблице 27. Хотя несколько факторов оказывали статистически значимое влияние на ответы, эти эффекты были небольшими, что приводило к относительно небольшим изменениям ответов на вариации факторов в этих стрессовых условиях. Фактором, который оказывал наибольший эффект, был уровень pH, влияющий на скорость образования вариантов, отличающихся зарядом, измеряемую с помощью CEX-UPLC. Несмотря на свою статистическую значимость, эффект был небольшим. Скорость образования кислотных соединений варьировала на 3,8% в месяц при варьировании уровня pH в диапазоне 6,0-6,6. В целом, в тестируемых стрессовых условиях вариации состава оказывали незначительное влияние на стабильность гаретосмаба. Вариация показателей скорости проиллюстрирована на фигуре 2. Во всех случаях разброс по сравнению с контролем не является существенным для общей стабильности состава.

Таблица 27. Статистически значимые ответы из окончательного исследования устойчивости составов на основе гаретосмаба, инкубированных при 40 °C/75%RH в течение 2 месяцев.

Ответ ^a	Фактор	Влияние на скорость в месяц ^b	p-значение ^c
HMW	Гаретосмаб	0,058	0,0011
HMW	уровень pH	-0,052	0,0022
HMW	Сахароза	-0,040	0,0081

HMW	Полисорбат 20	0,028	0,0357
Кислотные, СЕХ	уровень рН	3,771	<0,0001
Кислотные, СЕХ	Аргинин	-0,459	0,0230
Кислотные, СЕХ	Гистидин*рН	0,850	0,0008
Пик главного компонента, СЕХ	уровень рН	2,492	<0,0001
Основные, СЕХ	уровень рН	-1,250	<0,0001
Основные, СЕХ	Гистидин*рН	-0,654	0,0145
Кислотные, icIEF	рН	2,334	<0,0001
Кислотные, icIEF	Гистидин*рН	1,146	0,0042
Пик главного компонента, icIEF	Гаретосмаб	0,476	0,0374
Пик главного компонента, icIEF	уровень рН	1,804	<0,0001
Пик главного компонента, icIEF	Гистидин*рН	0,783	0,0102
Основные, icIEF	Гаретосмаб	0,244	0,0429
Основные, icIEF	уровень рН	-0,524	0,0014
Основные, icIEF	Аргинин	0,311	0,0376
Основные, icIEF	Гистидин*рН	-0,344	0,0251
Чистота, МСЕ в восстанавливающих условиях	Гаретосмаб	-0,333	0,0245
Чистота, МСЕ в восстанавливающих условиях	уровень рН	-0,369	0,0159

Чистота, MCE в восстанавливающих условиях	Сахароза	0,379	0,0137
LMW, MCE в восстанавливающих условиях	Гаретосмаб	0,246	0,0465
LMW, MCE в восстанавливающих условиях	уровень pH	0,343	0,0108

^a Регистрировалось как скорость образования или исчезновения отслеживаемых соединений.

^b Показатели скорости получены на основе взвешенных оценочных значений, регистрируемых в JMP. Регистрируемые показатели скорости в 2 раза превышают оценочные значения, поскольку оценочные значения являются половинными оценочными значениями.

^c p-значения $\leq 0,05$ соответствовали статистической значимости.

Результаты (режим ускоренного старения при температуре 25 °C/60%RH)

[00137] Образцы гаретосмаба в составах, перечисленных в таблице 24, инкубировали при 25 °C/60%RH в течение вплоть до 6 месяцев. Ответами, которые считались наиболее важными для DOE-анализа, были образование вариантов, отличающихся молекулярной массой, по результатам SE-UPLC и MCE, и образование вариантов, отличающихся зарядом, по результатам CEX-UPLC и icIEF. Дополнительные факторы, включая визуальную проверку, уровень pH, мутность, концентрацию и извлечение белка и уровни размера частиц, измеряли, но рассматривали их в контексте прохождения/не прохождения проверки или для информации и не использовали в DOE-анализе. Факторы, которые приводили к значимыми изменениям в отношении измеряемых ответов, перечислены в таблице 28. Хотя несколько факторов оказывали статистически значимое влияние на ответы, эти эффекты были небольшими, что приводило к менее чем 1% вариации скорости в месяц вследствие варьирования факторов, в этих условиях ускоренного старения. В тестируемых условиях ускоренного старения вариации состава оказывали незначительное влияние на стабильность гаретосмаба. Вариация показателей скорости проиллюстрирована на фигуре 3. Во всех случаях разброс по сравнению с контролем не является существенным для общей стабильности состава.

Таблица 28. Статистически значимые ответы из окончательного исследования устойчивости составов на основе гаретосмаба, инкубированных при 25°C/60%RH в течение 6 месяцев.

Ответ ^a	Фактор	Влияние на скорость в месяц ^b	p-значение ^c
HMW	Гаретосмаб	0,007	0,0011
HMW	уровень pH	0,004	0,0212
HMW	Сахароза	-0,005	0,0067
Кислотные, CEX	Гистидин	0,089	0,0415
Кислотные, CEX	уровень pH	0,730	<0,0001
Кислотные, CEX	Гистидин*pH	0,120	0,0103
Пик главного компонента, CEX	уровень pH	0,526	<0,0001
Основные, CEX	Гистидин	-0,040	0,0272
Основные, CEX	уровень pH	-0,210	<0,0001
Основные, CEX	Гистидин*pH	-0,052	0,0096
Кислотные, icIEF	Гистидин	0,198	0,0267
Кислотные, icIEF	уровень pH	0,577	<0,0001
Кислотные, icIEF	Гаретосмаб*pH	-0,162	0,0283
Кислотные, icIEF	Гистидин*pH	0,404	0,0007
Пик главного компонента, icIEF	Гистидин	0,169	0,0255
Пик главного компонента, icIEF	уровень pH	0,446	<0,0001
Пик главного компонента, icIEF	Гаретосмаб*pH	-0,121	0,0458
Пик главного компонента, icIEF	Гистидин*pH	0,247	0,0044

Основные, icIEF	уровень pH	-0,139	0,0064
Основные, icIEF	Гистидин*pH	-0,157	0,0079
Чистота, MCE в восстанавливающих условиях	уровень pH	-0,092	0,0142
Чистота, MCE в восстанавливающих условиях	Гаретосмаб*pH	-0,080	0,0298
LMW, MCE в восстанавливающих условиях	Гаретосмаб	0,042	0,0191
LMW, MCE в восстанавливающих условиях	уровень pH	0,067	0,0034
LMW, MCE в восстанавливающих условиях	Гаретосмаб*pH	0,042	0,0191
LMW, MCE в восстанавливающих условиях	Гистидин*pH	-0,081	0,0029
LMW, MCE в восстанавливающих условиях	Гистидин*гистидин	-0,106	0,0112
LMW, MCE в невосстанавливающих условиях	Гистидин*гистидин	0,142	0,0396
LMW, MCE в невосстанавливающих условиях	Аргинин*аргинин	0,153	0,0313

^a Регистрировалось как скорость образования или исчезновения отслеживаемых соединений.

^b Показатели скорости получены на основе взвешенных оценочных значений, регистрируемых в JMP. Регистрируемые показатели скорости в 2 раза превышают оценочные значения, поскольку оценочные значения являются половинными оценочными значениями.

^c р-значения $\leq 0,05$ соответствовали статистической значимости.

Результаты (стрессовые условия в виде перемешивания и замораживания и размораживания)

[00138] Стабильность составов на основе гаретосмаба, перечисленных в таблице 24, оценивали после 4 или 8 циклов замораживания и размораживания или спустя 30, 60 или 120 минут перемешивания путем перемешивания на вортексе. Оцениваемыми характеристиками качества были образование вариантов, отличающихся молекулярной массой, по результатам SE-UPLC и MCE, образование вариантов, отличающихся зарядом, по результатам CEX-UPLC и icIEF, визуальная проверка, уровень pH, мутность, концентрация и извлечение белка и уровни размера частиц. На фигуре 4 и фигуре 5 показаны сводные данные по влиянию варьирования компонентов состава, согласно DOE-дизайну, относительно контрольного состава, в котором все компоненты состава были номинальными, после 8 циклов замораживания и размораживания или спустя 120 минут перемешивания путем перемешивания на вортексе (на графиках обозначено как «разница относительно контроля»). Эти результаты указывают на то, что варьирование композиции состава не оказывает существенного влияния на стабильность гаретосмаба, относительно контрольного состава, в используемых стрессовых условиях.

Результаты (долгосрочное хранение при температуре 2-8 °C)

[00139] Приготовленные согласно DOE-дизайну образцы гаретосмаба в составах, перечисленных в таблице 24, хранили при 2-8 °C. К настоящему времени доступны данные по долгосрочной стабильности при хранении за 24 месяца для исследования устойчивости гаретосмаба. Изучали эффекты варьирования концентрации гаретосмаба, уровня pH, концентрации гистидина, концентрации аргинина, концентрации сахарозы и концентрации полисорбата 20 в отношении долгосрочной стабильности гаретосмаба. Оцениваемыми характеристиками качества были образование вариантов, отличающихся молекулярной массой, по результатам SE-UPLC и MCE, образование вариантов, отличающихся зарядом, по результатам CEX-UPLC и icIEF, визуальная проверка, уровень pH, мутность, концентрация и извлечение белка и уровни размера частиц. На Фиг. На фигурах 6-7 показаны сводные данные по влиянию варьирования компонентов состава, согласно DOE-дизайну, относительно контрольного состава, в котором все компоненты состава были номинальными. Эти результаты указывают на то, что спустя 12 или 24 месяцев хранения при 5 °C варьирование составов в пределах тестируемых диапазонов не оказывало существенного влияния на стабильность или качество гаретосмаба. С помощью либо визуальной проверки, либо измерений мутности (OD при 405 нм) не было выявлено какого-

либо осадка или видимых частиц. Никаких существенных изменений в отношении извлечения белка не наблюдали (RP-UPLC). Уровень pH составов был стабильным. В НІАС не наблюдали никаких заметных повышений в отношении невидимых невооруженным глазом частиц и не наблюдали никаких заметных различий в отношении количеств невидимых невооруженным глазом частиц относительно контрольного состава: в случае невидимых невооруженным глазом частиц, измеряемых с помощью НІАС, все значения были ниже приемлемых граничных значений, установленных USP <788>; невидимые невооруженным глазом частицы также измеряли с помощью MFI. Количественное содержание частиц изменялось, однако существенных изменений в отношении невидимых невооруженным глазом частиц относительно контроля или между составами в случае частиц размером 10 мкм или 25 мкм не наблюдали. Со временем наблюдали тенденцию к повышению количественного содержания частиц размером 2-10 мкм, однако такие различия не считались заметными.

[00140] Статистический анализ результатов указывает на то, что различия среди составов главным образом обусловлены случайной вариацией, а не вариацией факторов (фигуры 6-7); относительно контрольного состава, каких-либо существенных различий в уровнях HMW-соединений, LMW-соединений или нативного гаретосмаба, как определено с помощью SE-UPLC или MCE, не наблюдали; и, относительно контрольного состава, каких-либо существенных различий в уровнях отличающихся зарядом вариантов, кислотных или основных, как определено с помощью CEX-UPLC или icIEF, не наблюдали.

[00141] Результаты этого исследования продемонстрировали, что варьирование факторов состава (концентрация гаретосмаба, уровень pH, концентрация гистидина, концентрация аргинина, концентрация сахарозы и концентрация полисорбата 20) в пределах исследуемых диапазонов не оказывало заметного влияния на долгосрочную стабильность гаретосмаба. Состав на основе 60 мг/мл гаретосмаба является устойчивым с учетом всех характеристик качества в пределах тестируемого диапазона композиции состава.

Сводные данные по устойчивости состава на основе гаретосмаба

[00142] Исследования по устойчивости состава проводили для оценки эффекта вариаций параметров состава в отношении стабильности состава на основе гаретосмаба. В DOE-исследовании, в котором оценивали стабильность при долгосрочном хранении, при воздействии режима ускоренного старения и при воздействии стрессовых условий, было продемонстрировано, что вариация параметров состава в пределах исследуемого диапазона не оказывала заметное влияние на качество и стабильность гаретосмаба.

[00143] В частности, предложенный коммерческий состав на основе гаретосмаба 60 мг/мл является устойчивым в отношении $\pm 10\%$ вариации концентрации белка, $\pm 20\%$ вариации концентрации сахарозы, аргинина и/или гистидина, $\pm 50\%$ вариации концентрации полисорбата 20 и/или вариации уровня pH в пределах $\pm 0,3$ единицы. В целом, результаты исследования устойчивости 60 мг/мл гаретосмаба подтверждают, что вариация композиции состава на основе гаретосмаба в пределах исследуемых диапазонов

не будет оказывать негативное воздействие на стабильность или качество DP на основе гаретосмаба в рекомендуемых условиях хранения (2-8 °C).

Выводы

[00144] Исходя из представленных результатов исследований по разработке состава, а также клинической практики, был разработан коммерческий состав на основе гаретосмаба для IV инфузии, который содержит следующие компоненты: 60 мг/мл гаретосмаба, 10 мМ L-гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, 70 мМ L-аргинина HCl, 0,05% (мас./об.) полисорбата 20 и уровень pH 6,3. Этот коммерческий состав для IV применения соответствует целям, определенным при разработке состава. Разработанный состав представляет собой жидкий состав в стеклянных флаконах с концентрацией гаретосмаба, достаточной для доставки гаретосмаба в дозе 10 мг/кг путем внутривенной (IV) инфузии. DP на основе гаретосмаба имеет концентрацию 60 мг/мл и изготовлен в извлекаемом объеме 5 мл для обеспечения 300 мг на флакон. Состав представляет собой близкий к изоосмолярному состав, совместимый с 0,9% физиологическим раствором для инъекций или раствором для инъекций с 5% декстрозой для IV инфузии. Состав совместим с прозрачными стеклянными флаконами 1 типа и стандартной резиновой пробкой в качестве первичной упаковочной системы, и стабилен в такой упаковке. Состав представляет собой стерильный DP, который сохраняет долгосрочную стабильность, при этом срок его хранения составляет 24 месяца или больше при 2-8 °C. Никаких существенных изменений в отношении характеристик качества гаретосмаба в случае хранения при 2-8 °C в течение вплоть до 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев не наблюдали. Состав представляет собой устойчивый состав, в котором сводится к минимуму образование соединений гаретосмаба с высокой молекулярной массой (HMW), сводятся к минимуму изменения в отношении относительного распределения вариантов соединений гаретосмаба, отличающихся зарядом, невидимые невооруженным глазом частицы сохраняются на безопасном уровне и сохраняется биологическая активность при воздействии стрессовых условий при манипуляциях и термического стресса. Состав представляет собой состав, который легко преобразуется в состав для подкожного (SC) введения. Концентрация лекарственной субстанции в составе на основе гаретосмаба составляет 200 мг/мл.

Пример 5. Допустимые избытки

[00145] Допустимые избытки не были включены в состав; однако было включено небольшое дополнительное количество препарата для компенсации нормальных вариаций объема наполнения, возникающих во время завершения автоматического процесса наполнения, и гарантии, что из флакона может быть взят правильный объем. DP для клинического применения был изготовлен с минимальным объемом наполнения 5,44 мл. В каждом флаконе содержались дополнительные 0,44 мл препарата, что является достаточным для точного отбора 5,0 мл (300 мг) DP из флакона.

[00146] Дизайном не был предусмотрен допустимый избыток для компенсации потерь в процессе производства, деградации в процессе производства, деградации в процессе хранения (срока хранения) или для продления срока годности. Эти допустимые

избытки были предназначены для обеспечения точного отбора и введения 5,0 мл DP (например, 300 мг гаретосмаба).

Пример 6. Способы, используемые для оценки стабильности

[00147] Стабильность DP на основе гаретосмаба в ходе исследования оценивали с использованием разных анализов. Цвет и внешний вид оценивали путем визуальной проверки. Мутность измеряли по увеличению оптической плотности (OD) при 405 нм. Механические включения определяли с использованием метода светотени (HIAC). Механические включения оценивали с использованием Micro-Flow Imaging™ (MFI). Концентрацию белка оценивали с помощью обращенно-фазовой сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (RP-UPLC). Чистоту каждого отдельного DP оценивали с использованием следующих анализов: эксклюзионная сверхпроизводительная жидкостная хроматография (SE-UPLC); капиллярный электрофорез на микрочипе (MCE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

[00148] Анализ вариантов, отличающихся зарядом, проводили с использованием следующих анализов: катионообменная UPLC (CEX-UPLC); и изоэлектрическое фокусирование с постоянным детектированием по всей длине капилляра (iCIEF). Варианты, отличающиеся зарядом, регистрировались как область 1, область 2 и область 3 в процентах. Область 1 соответствует кислотным соединениям, которые элюируются перед главным компонентом, область 2 соответствует главному компоненту и область 3 соответствует основным соединениям, которые элюируются после главного компонента.

[00149] Активность оценивали с использованием биологического анализа. Относительную активность каждого образца определяли с помощью биологического анализа, и она определялась следующим образом: $(IC_{50} \text{ эталонного образца} / IC_{50} \text{ тестируемого образца}) \times 100\%$. Измеренная активность образцов из исследования стабильности при хранении должна быть в пределах 50-150% от измеренной активности эталонного образца.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ПРОИЗВОЛЬНОЙ ФОРМЕ

SEQ ID NO.: 1

GGSFSSH

SEQ ID NO.: 2

ILYTGGT

SEQ ID NO.: 3

ARARSGITFTGIIVPGSFDI

SEQ ID NO.: 4

QSVSSSY

SEQ ID NO.: 5

GAS

SEQ ID NO.: 6

QQYGSSPWT

SEQ ID NO: 7

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSFS SHFWSWIRQP PGKGLEWIGY
ILYTGGTSFN PSLKSRVSMS VGTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARARS GITFTGIIVP
GSFDIWGQGT MVTVSS

SEQ ID NO: 8

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический состав, содержащий: (i) антитело к А-активину человека или его антигенсвязывающую часть; (ii) буфер с уровнем pH $6,3 \pm 0,3$; (iii) органический соразтворитель; и (iv) один или несколько термостабилизаторов.

2. Фармацевтический состав по п. 1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающая часть содержат следующие шесть последовательностей CDR:

HCDR1, имеющая последовательность GGSFSSH (SEQ ID NO.: 1);

HCDR2, имеющая последовательность ILYTGGT (SEQ ID NO.: 2);

HCDR3, имеющая последовательность ARARSGITFTGIIVPGSFDI (SEQ ID NO.: 3);

LCDR1, имеющая последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO.: 4);

LCDR2, имеющая последовательность GAS (SEQ ID NO.: 5); и

LCDR3, имеющая последовательность QQYGSSPWT (SEQ ID NO.: 6).

3. Фармацевтический состав по п. 1 или 2, отличающийся тем, что антитело имеет молекулярную массу около 145235,3 Да.

4. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что концентрация антитела или его антигенсвязывающей части составляет $60 \text{ мг/мл} \pm 6 \text{ мг/мл}$.

5. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что буфер представляет собой гистидиновый буфер.

6. Фармацевтический состав по п. 5, отличающийся тем, что концентрация гистидина составляет $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$.

7. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что органический соразтворитель представляет собой полисорбат 20.

8. Фармацевтический состав по п. 7, отличающийся тем, что концентрация полисорбата 20 составляет $0,05\% \text{ мас./об.} \pm 0,025\%$.

9. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что один или несколько термостабилизаторов включают сахарозу и аргинин.

10. Фармацевтический состав по п. 9, отличающийся тем, что концентрация сахарозы составляет $5\% \pm 1\% \text{ (мас./об.)}$ и концентрация аргинина составляет $70 \text{ mM} \pm 14 \text{ mM}$.

11. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, содержащий $60 \text{ мг/мл} \pm 6 \text{ мг/мл}$ антитела, $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ гистидина, уровень pH $6,3 \pm 0,3$, $0,05\% \text{ мас./об.} \pm 0,025\%$ полисорбата 20, $5\% \text{ мас./об.} \pm 1\%$ сахарозы и $70 \text{ mM} \pm 14 \text{ mM}$ аргинина.

12. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что спустя 56 суток хранения при 40°C и 75% относительной влажности (RH) по меньшей мере 90% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 30% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

13. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что спустя 56 суток хранения при 40°C и 75% RH по меньшей мере 93% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по

меньшей мере 34,5% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

14. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что спустя 56 суток хранения при 40 °С и 75% RH по меньшей мере 97% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 45% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

15. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя шесть месяцев хранения при 25 °С и 60% RH по меньшей мере 90% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 40% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

16. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя шесть месяцев хранения при 25 °С и 60% RH по меньшей мере 95% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 45% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

17. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя шесть месяцев хранения при 25 °С и 60% RH по меньшей мере 98% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию или по меньшей мере 50% антитела или его антигенсвязывающей части находится в главной по заряду форме.

18. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 12 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 94% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 45% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 100% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

19. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 12 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 96% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 50% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 100% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

20. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 12 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 98% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 55% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 100% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

21. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 18 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 94% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 45% антитела

или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 95% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

22. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 18 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 96% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 50% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 95% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

23. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 18 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 98% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 55% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 95% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

24. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 24 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 94% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 45% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 99% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

25. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 24 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 96% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 50% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 99% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

26. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спустя 24 месяцев хранения при 2-8 °С по меньшей мере 98% антитела или его антигенсвязывающей части имеет нативную конформацию, по меньшей мере 55% антитела или его антигенсвязывающей части является главным по заряду вариантом и/или антитело сохраняет по меньшей мере 99% от активности антитела или его антигенсвязывающей части до хранения.

27. Фармацевтический состав, содержащий (а) 60 мг/мл $\pm$ 10 мг/мл антитела к А-активину человека или его антигенсвязывающей части, (b) 10 мМ $\pm$ 2 мМ гистидина, уровень рН 6,3 $\pm$ 0,3, (с) 0,05% $\pm$ 0,025% полисорбата 20, (d) 70 мМ $\pm$ 14 мМ аргинина и (е) 5% $\pm$ 1% сахарозы, причем антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8.

28. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, который содержится в контейнере.

29. Фармацевтический состав по п. 28, отличающийся тем, что контейнер представляет собой флакон.

30. Фармацевтический состав по п. 29, отличающийся тем, что флакон является стеклянным.

31. Фармацевтический состав по п. 30, отличающийся тем, что стекло представляет собой боросиликатное стекло 1 типа с бутилкаучуковой пробкой 4432/50 с покрытием FluroTec®.

32. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, который является подходящим для внутривенного введения нуждающемуся в этом субъекту-человеку.

33. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-31, который является подходящим для подкожного введения нуждающемуся в этом субъекту-человеку.

34. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, который является жидким составом.

35. Фармацевтический состав по любому из пп. 1-33, который является лиофилизированным составом.

36. Набор, содержащий фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, контейнер и инструкции по его применению.

37. Набор по п. 36, отличающийся тем, что контейнер представляет собой стеклянный флакон с хлорбутилкаучуковой пробкой с покрытием FluroTec®.

38. Способ лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью А-активина, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-35 нуждающемуся в этом субъекту.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что заболевание или нарушение, ассоциированное с активностью А-активина, представляет собой прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию (FOP).

По доверенности

1/7

Фиг. 1

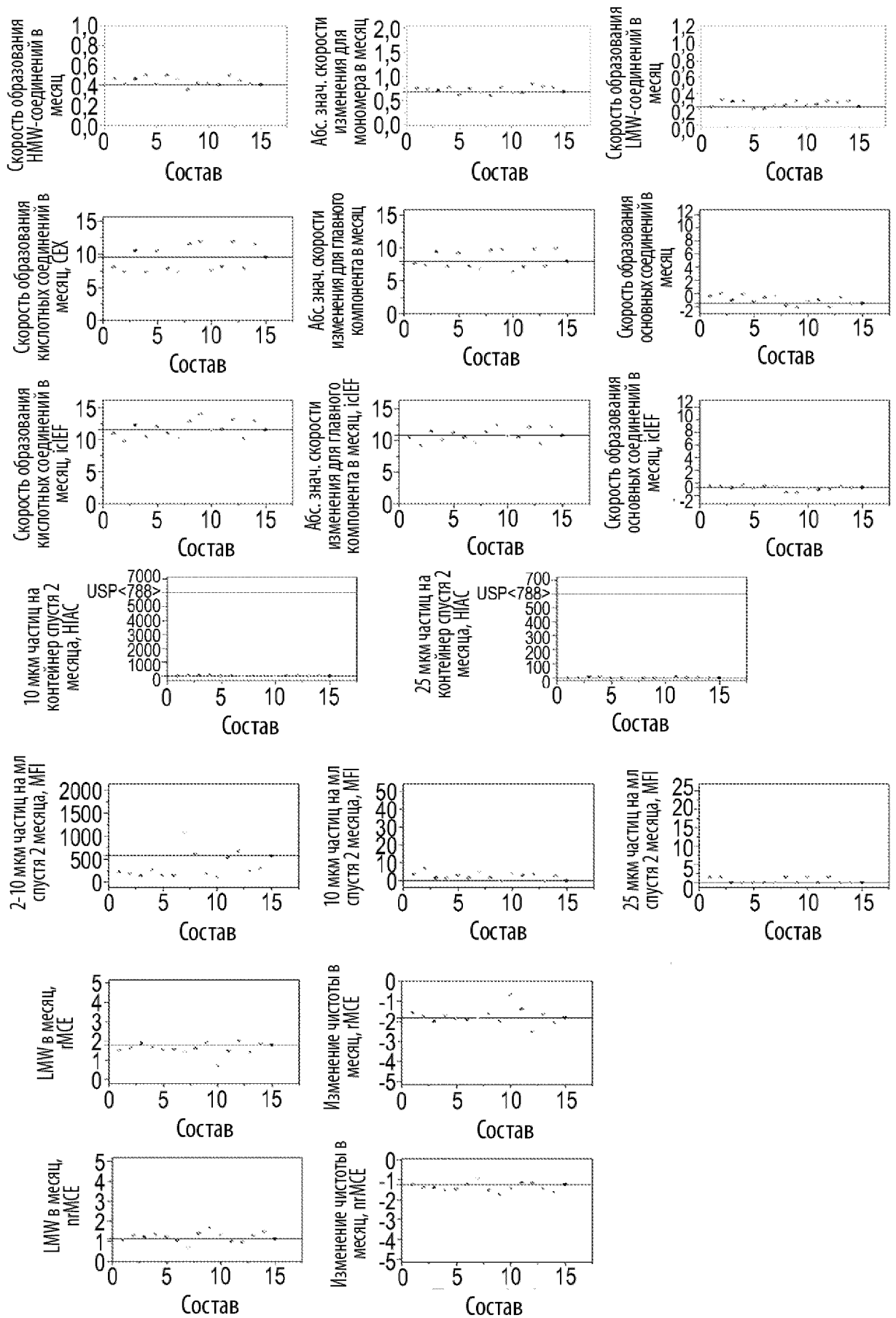
Тяжелая цепь (SEQ ID NO:9)

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSFS SEFWSWIRQP PGKGLEWIGY ILYTGGTSEF⁶⁰
PSLKSRVSMS VGTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARARS GITFTGIIVP GGFEDIWGQGT¹²⁰
MVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP
AVLQSSGLYS LSSVTVFPSS SLGTKTYTCN VDHKPSNTKV DKRVESKYGP PCPPCPAPEF
CPFC
LGGPSVFLEP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKFREE
QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDGSF FLYSRLTVDK
SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL LGK

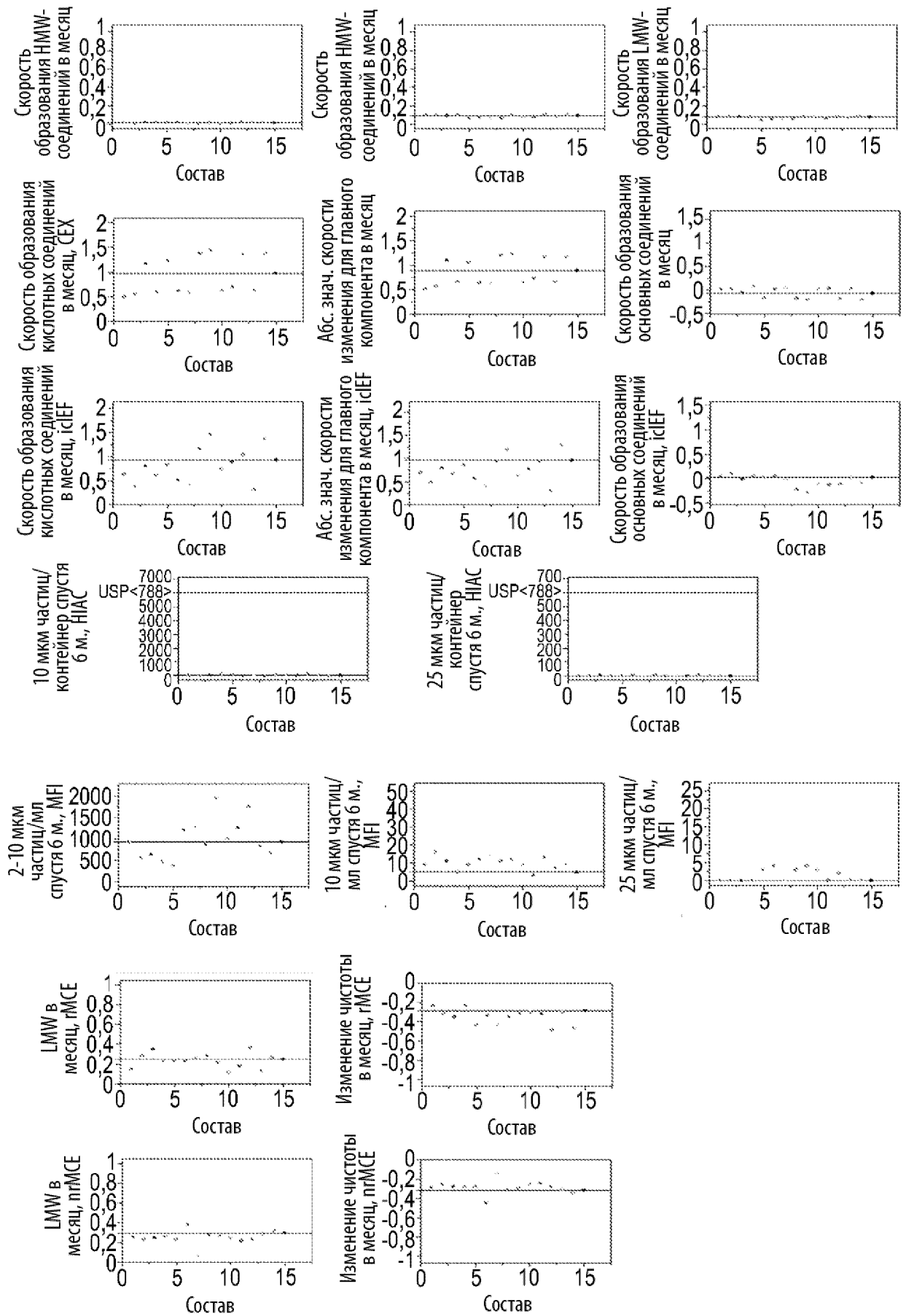
Легкая цепь (SEQ ID NO:10)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP
DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSFWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP
PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL
TLSKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGE

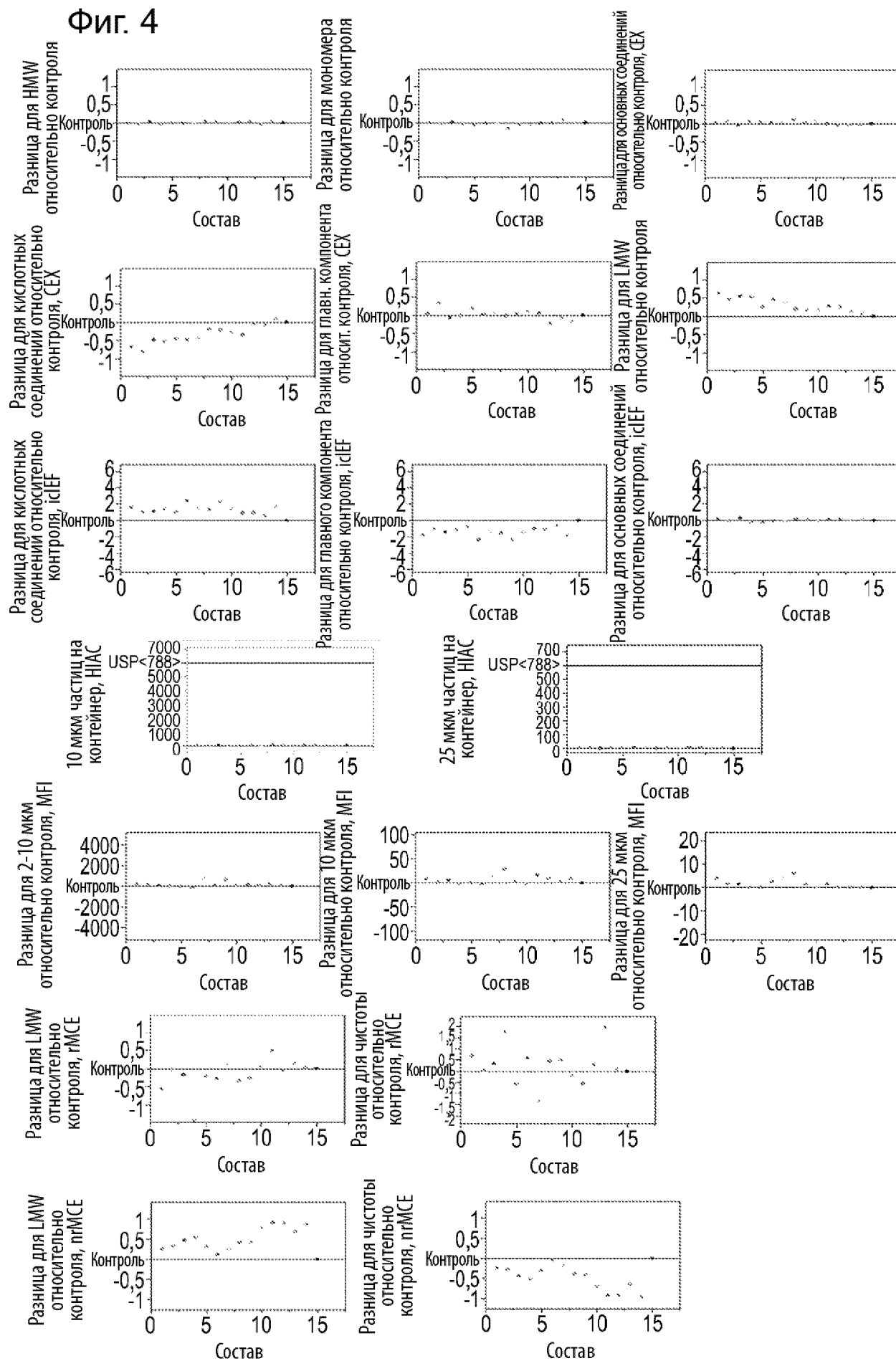
Фиг. 2



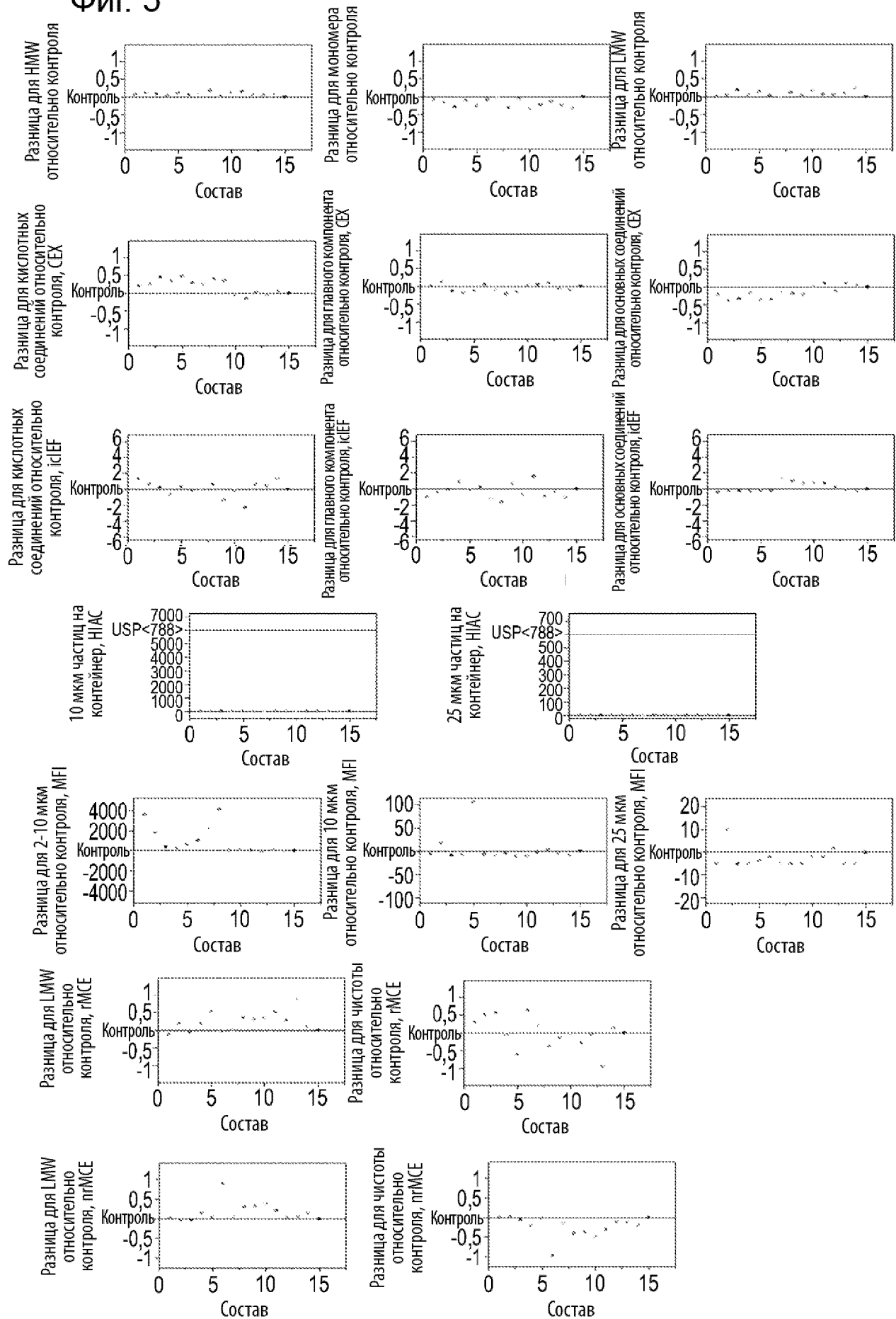
Фиг. 3



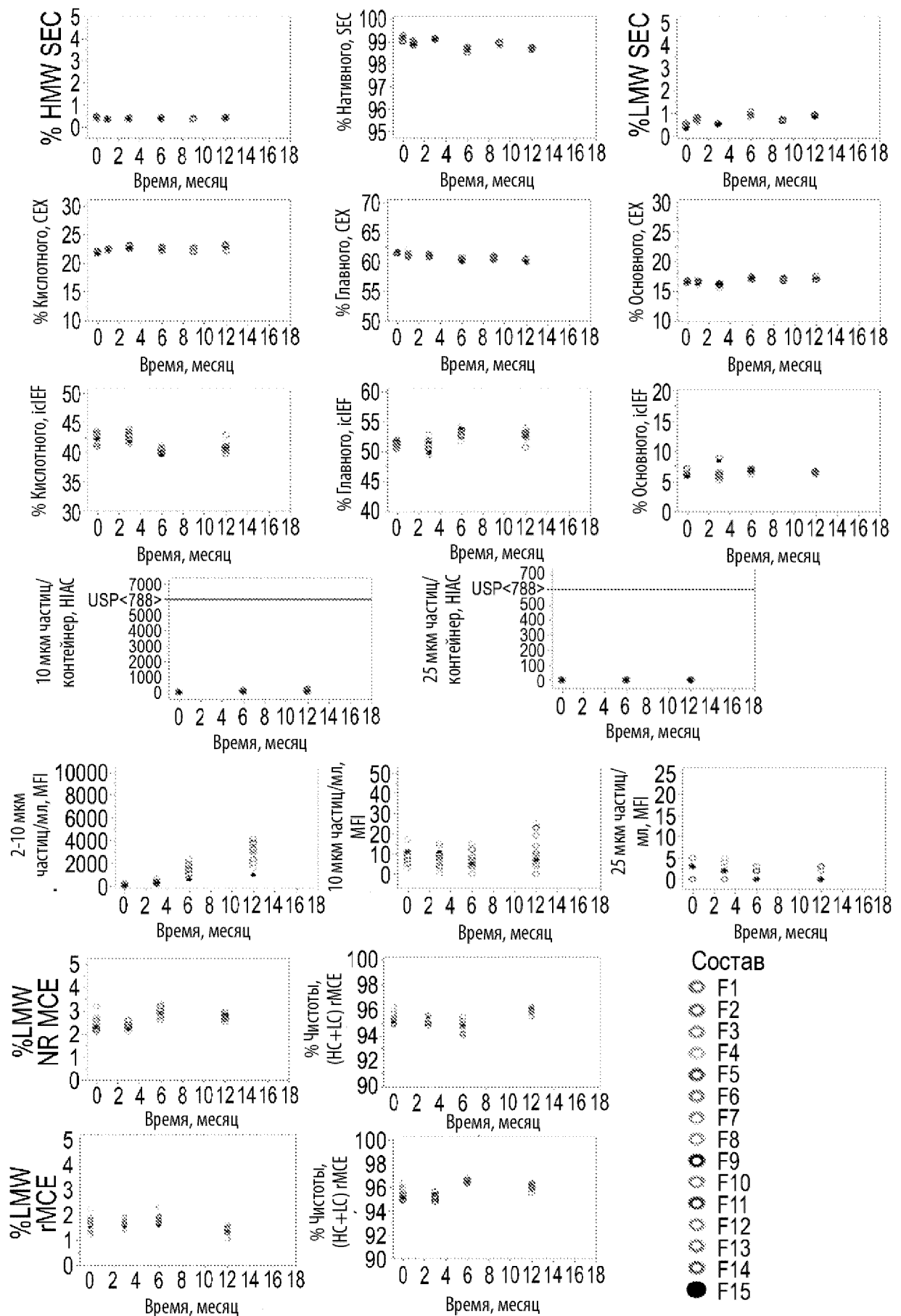
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

