

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390191 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.10(22) Дата подачи заявки
2021.06.25

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СОСТАВ АНТИТЕЛА ПРОТИВ FcRn

(31) 10-2020-0079135

(32) 2020.06.29

(33) KR

(86) PCT/KR2021/008000

(87) WO 2022/005113 2022.01.06

(71) Заявитель:

ХАНАЛЛ БАЙОФАРМА КО., ЛТД.
(KR)

(72) Изобретатель:

Ахн Хеа Киунг, Ким Йоунг Чу, Чунг
Ми Чин (KR)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В одном аспекте настоящего изобретения предусматривается фармацевтический состав, имеющий pH от 4,0 до 8,0, содержащий (а) антитело против HL161BKN или его фрагмент, (b) по меньшей мере одну добавку, выбранную из маннита, сорбита, аргинина, гистидина, глицина и их солей, (с) буферную систему, выбранную из цитрата или гистидина, и (d) поверхностно-активное вещество. HL161BKN, присутствующее в составе, имеет повышенную стабильность и является нетоксичным и, таким образом, имеет высокий потенциал для промышленного применения.



A1

202390191

202390191

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576595EA/072

СОСТАВ АНТИТЕЛА ПРОТИВ FcRn

Область техники

Настоящее изобретение относится к составу, оптимизированному для HL161BKN, представляющего собой антитело против FcRn.

Уровень техники

Причины аутоиммунных заболеваний исследуются в течение долгого времени с генетической, средовой и иммунологической точки зрения, однако точная причина заболевания все еще неизвестна. Многие последние исследования показали, что ряд аутоиммунных заболеваний вызывается аутоантителами типа IgG. В действительности, в испытаниях для диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний взаимосвязь между присутствием или отсутствием специфических для заболевания аутоантител и терапевтическим эффектом в зависимости от их снижения широко исследуется.

В качестве терапевтического средства против таких аутоиммунных заболеваний средством первой линии является системная инъекция стероидов в высокой дозе, и, когда симптомы являются серьезными или трудно контролируются стероидами, применяют введение IVIG (внутривенный иммуноглобулин) в высокой дозе или плазмаферез. Стероид в высокой дозе может иметь слабый эффект или иметь серьезные побочные эффекты при многократном применении. В случае IVIG и плазмафереза, стоимость лечения является высокой, и существуют различные побочные эффекты и риски инфекции, таким образом, срочно необходима разработка терапевтического средства для этой области терапии.

С другой стороны, в последнее время исследуется терапевтическое средство против аутоиммунного заболевания с использованием антитела против FcRn (публикация патента Кореи № 10-2014-0147606). Оно представляет собой лекарственное средство с новой стратегией, в соответствии с которой антитело блокирует FcRn (неонатальный Fc-рецептор), который вовлечен в рециркуляцию IgG и усиливает катаболизм IgG в организме, тем самым снижая уровни аутоантител для лечения заболеваний. Ожидается, что это антитело против FcRn будет продуктом, который может решить проблемы существующих терапевтических средств.

Однако для применения этого антитела при тяжелых аутоиммунных заболеваниях, таких как пемфигус обыкновенный, оптический нейромиеелит и миастения, которые вызываются образованием аутоантител против аутоантигена в организме, требуется состав, оптимизированный для этого антитела, и состав, оптимизированный для данного способа введения.

Документ уровня техники

Патентный документ

(Патентный документ 1) KR 10-2014-0147606 A

Описание изобретения

Техническая проблема

В результате исследования для разработки состава, оптимизированного для антитела против FcRn, для лечения тяжелых аутоиммунных заболеваний авторы настоящего изобретения разработали буфер и состав, оптимизированные для HL161BKN, представляющего собой антитело против FcRn.

Решение проблемы

Для достижения указанной выше задачи в одном аспекте настоящего изобретения предусматривается фармацевтический состав, содержащий (a) антитело против FcRn или его фрагмент, (b) по меньшей мере одну добавку, выбранную из маннита, сорбита, аргинина, гистидина, глицина и их солей, (c) буферную систему, выбранную из цитрата или гистидина, и (d) поверхностно-активное вещество.

Эффекты изобретения

Фармацевтический состав в соответствии с настоящим изобретением, имеющий pH 4,0-8,0, содержащий (a) антитело против FcRn или его фрагмент, (b) по меньшей мере одну добавку, выбранную из маннита, сорбита, аргинина, гистидина, глицина и их солей, (c) буферную систему, выбранную из цитрата или гистидина, и (d) поверхностно-активное вещество, представляет собой фармацевтическую композицию, оптимизированную для HL161BKN, и было подтверждено, что стабильность HL161BKN в составе повышается.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 проиллюстрирован результат, полученный путем анализа термической стабильности HL161BKN с использованием DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия).

На фиг.2 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения стабильности в ускоренном 4-недельном испытании стабильности HL161BKN в условиях натрий цитратного-фосфатного буфера при pH 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0.

На фиг.3 представлена схематическая диаграмма процесса исследования состава HL161BKN.

На фиг.4 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения величины изменения уровня агрегатов и фрагментов HL161BKN (210 мг/мл), образовавшихся с различными эксципиентами в результате теста эксципиентов.

На фиг.5 проиллюстрирован результат, полученный путем анализа паттерна зарядовых вариантов HL161BKN (210 мг/мл) в соответствии с каждым условием эксципиентов при использовании СЕХ-ВЭЖХ.

На фиг.6 проиллюстрирован результат дисперсионного анализа (ANOVA) величины изменения уровня агрегатов HL161BKN в зависимости от комбинации эксципиентов.

На фиг.7 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения величины изменения уровня образовавшихся агрегатов и фрагментов HL161BKN (210 мг/мл) в зависимости от комбинации эксципиентов.

На фиг.8 проиллюстрирован результат, полученный путем анализа величины изменения уровня агрегатов и фрагментов HL161BKN в зависимости от комбинации эксципиентов при использовании планирования эксперимента (DOE).

На фиг.9 проиллюстрирован результат, полученный путем анализа паттерна зарядовых вариантов HL161BKN в зависимости от комбинации эксципиентов при использовании СЕХ-ВЭЖХ.

На фиг.10 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения величины изменения уровня агрегатов и фрагментов HL161BKN (210 мг/мл) в дополнительном тесте эксципиентов.

На фиг.11 проиллюстрирован результат, полученный путем анализа паттерна зарядовых вариантов HL161BKN в зависимости от условий эксципиентов в дополнительном тесте эксципиентов с использованием СЕХ-ВЭЖХ.

На фиг.12 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения эффекта на HL161BKN (210 мг/мл) стресса, вызываемого перемешиванием, в зависимости от присутствия или отсутствия PSB20.

На фиг.13 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения изменения мономеров HL161BKN в зависимости от присутствия или отсутствия PSB20 в тесте с перемешиванием.

На фиг.14 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения величины изменения агрегатов и фрагментов HL161BKN (210 мг/мл) в тесте эксципиентов со снижением вязкости.

На фиг.15 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения изменения агрегатов и фрагментов HL161BKN (210 мг/мл) в первом скрининге эксципиентов.

На фиг.16 проиллюстрирован результат, полученный путем анализа паттерна зарядовых вариантов HL161BKN в соответствии с условиями первого скрининга эксципиентов с использованием СЕХ-ВЭЖХ.

На фиг.17 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения изменения агрегатов и фрагментов HL161BKN (210 мг/мл) во втором скрининге эксципиентов.

На фиг.18 проиллюстрирован результат, полученный путем анализа паттерна зарядовых вариантов HL161BKN в соответствии со вторыми условиями эксципиентов с использованием СЕХ-ВЭЖХ.

На фиг.19 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения изменения количества нерастворимых частиц HL161BKN, невидимых невооруженным глазом.

На фиг.20 проиллюстрирован результат, полученный путем подтверждения вязкости, в зависимости от концентрации HL161BKN в составе HL161BKN. Здесь, когда HL161BKN присутствовало в концентрации 170 мг/мл, была подтверждена вязкость 10 сПз.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предусматривается фармацевтический состав, имеющий рН от 4,0 до 8,0, содержащий (а) антитело против FcRn или его фрагмент, (b) по меньшей мере одну добавку, выбранную из маннита, сорбита, аргинина, гистидина,

глицина и их солей, (с) буферную систему, выбранную из цитрата или гистидина и (d) поверхностно-активное вещество.

Кроме того, фармацевтический состав может дополнительно содержать метионин. Кроме того, фармацевтический состав может дополнительно содержать сахараиды, такие как сахароза и трегалоза.

Буферная система относится к буферу, который является устойчивым к изменениям pH благодаря его кислотно-основным составным частям.

Как используют в рамках изобретения, термин "гистидиновый буфер" относится к буферу, содержащему ион гистидина. В рамках настоящего изобретения конкретные варианты осуществления гистидинового буфера могут быть любыми, выбранными из группы, состоящей из гистидин-хлоридного буфера, гистидин-ацетатного буфера, гистидин-фосфатного буфера и гистидин-сульфатного буфера, но не ограничиваясь ими.

Как используют в рамках изобретения, термин "цитратный буфер" относится к буферу, содержащему цитратный ион. В рамках настоящего изобретения, конкретные варианты осуществления цитратного буфера могут быть любыми, выбранными из группы, состоящей из натрий-цитратного буфера, калий-цитратного буфера, кальций-цитратного буфера и магний-цитратного буфера, но не ограничиваясь ими.

Как используют в рамках изобретения, термин "поверхностно-активное вещество" относится к фармацевтически приемлемому эксципиенту, который используют для защиты белкового состава от механического стресса, такого как перемешивание и сдвиговое усилие. Конкретные варианты осуществления поверхностно-активного вещества могут представлять собой любое поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80, полуксамера, Triton, додецилсульфата натрия, лаурилсульфоната натрия, октилглюкозида натрия, лаурилсульфобетаина, миристилсульфобетаина, линолеилсульфобетаина, стеарилсульфобетаина, лаурилсаркозина, миристилсаркозина, линолеилсаркозина, стеарилсаркозина, линолеилбетаина, миристилбетаина, цетилбетаина, лауриламидопропилбетаина, кокамидопропилбетаина, линолеамидопропилбетаина, миристамидопропилбетаина, пальмитоиламидопропилбетаина, изостеарамидапропилбетаина, миристамидопропилдиметиламина, пальмитоиламидопропилдиметиламина, изостеарамидапропилдиметиламина, натрий метилкокацила, метилолеилтаурата натрия, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля и сополимера этилена и пропиленгликоля. В рамках настоящего изобретения поверхностно-активное вещество предпочтительно может представлять собой полисорбат 20.

Кроме того, фармацевтический состав может представлять собой водный состав, предпочтительно инъекционный жидкий состав.

В рамках настоящего изобретения, антитело против FcRn может представлять собой HL161BKN.

HL161BKN содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую H-CDR1, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 5, H-CDR2, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 6,

и H-CDR3, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую L-CDR1, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 8, L-CDR2, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 9, и L-CDR3, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 10.

Кроме того, HL161BKN может содержать области тяжелой цепи и легкой цепи, представленные в таблице 1 ниже. Кроме того, тяжелая цепь и легкая цепь могут кодироваться нуклеиновыми кислотами, представленными в таблице 2.

[Таблица 1]

Элемент	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Тяжелая цепь	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSL SFSYVWVIR QPPGKGLEWI GTIYYSGNTY YNPSLKSRIT ISVDTSKNHF SLKLSSVTAA DTAVYYCARR AGILTGYLDS WGQGTLLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKHTTC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDS DGSFLL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG	1
Легкая цепь	SYVLTQSPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDD SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	2

Участки гликозилирования антитела являются следующими: Asn301, N-гликан (G0F, G1F, G0-GlcNac, Man5).

[Таблица 2]

[illegible]

В рамках настоящего изобретения фармацевтический состав может иметь вязкость 20 сПз или менее. В частности, фармацевтический состав может иметь вязкость от 1 сПз до 20 сПз. Кроме того, фармацевтический состав может иметь вязкость от 10 сПз до 20 сПз, и может иметь вязкость приблизительно 10 сПз, приблизительно 11 сПз, приблизительно 12 сПз, приблизительно 13 сПз, приблизительно 14 сПз, приблизительно 15 сПз, приблизительно 16 сПз, приблизительно 17 сПз, приблизительно 18 сПз, приблизительно 19 сПз или приблизительно 20 сПз.

Кроме того, фармацевтический состав может иметь осмолярность от 250 мосм/кг до 500 мосм/кг. В частности, фармацевтический состав может иметь осмолярность от 300 мосм/кг до 450 мосм/кг или от 350 мосм/кг до 400 мосм/кг. Кроме того, фармацевтический состав может иметь осмолярность приблизительно 250 мосм/кг, приблизительно 260 мосм/кг, приблизительно 270 мосм/кг, приблизительно 280 мосм/кг, приблизительно 290 мосм/кг, приблизительно 300 мосм/кг, приблизительно 310 мосм/кг, приблизительно 320 мосм/кг, приблизительно 330 мосм/кг, приблизительно 340 мосм/кг, приблизительно 350 мосм/кг, приблизительно 360 мосм/кг, приблизительно 370 мосм/кг, приблизительно 380 мосм/кг, приблизительно 390 мосм/кг, приблизительно 400 мосм/кг, приблизительно 410 мосм/кг, приблизительно 420 мосм/кг, приблизительно 430 мосм/кг, приблизительно 440 мосм/кг, приблизительно 450 мосм/кг, приблизительно 460 мосм/кг, приблизительно 470 мосм/кг, приблизительно 480 мосм/кг, приблизительно 490 мосм/кг или приблизительно 500 мосм/кг.

Кроме того, фармацевтический состав может включать HL161BKN в концентрации от 50 мг/мл до 250 мг/мл. В частности, фармацевтический состав может включать HL161BKN в концентрации от 60 мг/мл до 250 мг/мл, от 70 мг/мл до 250 мг/мл, от 80 мг/мл до 250 мг/мл, от 90 мг/мл до 250 мг/мл или от 100 мг/мл до 250 мг/мл. Кроме того, фармацевтический состав может включать HL161BKN в концентрации от 120 мг/мл до 230 мг/мл, от 150 мг/мл до 220 мг/мл или от 180 мг/мл до 210 мг/мл. Кроме того, фармацевтический состав может включать HL161BKN в концентрации приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизительно 170 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 210 мг/мл, приблизительно 220 мг/мл, приблизительно 230 мг/мл, приблизительно 240 мг/мл или приблизительно 250 мг/мл.

Кроме того, фармацевтический состав может иметь pH от 4,0 до 8,0. В частности, фармацевтический состав может иметь pH от 4,0 до 7,0. Предпочтительно, фармацевтический состав может иметь pH от 5,0 до 6,0. Кроме того, фармацевтический состав может иметь pH приблизительно 5,0, pH приблизительно 5,1, pH приблизительно 5,2, pH приблизительно 5,3, pH приблизительно 5,4, pH приблизительно 5,5, pH приблизительно 5,6, pH приблизительно 5,7, pH приблизительно 5,8, pH приблизительно

5,9, pH приблизительно 6,0, pH приблизительно 6,1, pH приблизительно 6,2, pH приблизительно 6,3, pH приблизительно 6,4, pH приблизительно 6,5, pH приблизительно 6,6, pH приблизительно 6,7, pH приблизительно 6,8, pH приблизительно 6,9 или pH приблизительно 7,0.

Кроме того, добавка может быть включена в концентрации от 10 мМ до 400 мМ. В рамках настоящего изобретения, в качестве добавки маннит, сорбит, аргинин, гистидин или глицин может использоваться отдельно, или два или более из них могут использоваться в комбинации. В частности, добавка может быть включена в концентрации от 10 мМ до 400 мМ, от 20 до 300 мМ, от 50 мМ до 250 мМ, или от 100 мМ до 150 мМ, соответственно. В частности, добавка может быть включена в концентрации приблизительно 10 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 110 мМ, приблизительно 120 мМ, приблизительно 130 мМ, приблизительно 140 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 160 мМ, приблизительно 170 мМ, приблизительно 180 мМ, приблизительно 190 мМ, приблизительно 200 мМ, приблизительно 210 мМ, приблизительно 220 мМ, приблизительно 230 мМ, приблизительно 240 мМ, приблизительно 250 мМ, приблизительно 260 мМ, приблизительно 270 мМ, приблизительно 280 мМ, приблизительно 290 мМ и л и приблизительно 300 мМ, соответственно.

Кроме того, две добавки могут использоваться в комбинации. В одном варианте осуществления добавка может включать маннит и сорбит. В одном варианте осуществления добавка может включать маннит и аргинин. В одном варианте осуществления добавка может включать маннит и гистидин. В одном варианте осуществления добавка может включать маннит и глицин. В одном варианте осуществления добавка может включать сорбит и аргинин. В одном варианте осуществления добавка может включать сорбит и гистидин. В одном варианте осуществления добавка может включать сорбит и глицин. В одном варианте осуществления добавка может включать аргинин и гистидин. В одном варианте осуществления добавка может включать аргинин и глицин. В одном варианте осуществления добавка может включать гистидин и глицин. В рамках настоящего изобретения, каждая добавка может быть включена в фармацевтический состав в вышеупомянутой концентрации.

Один вариант осуществления фармацевтический состав может представлять собой фармацевтический состав, имеющий pH от 5,0 до 6,0, содержащий (a) от 100 мг/мл до 250 мг/мл антитела против FcRn, (b) 50-250 мМ L-аргинин или его соль хлористоводородной кислоты, (c) 50-250 мМ L-гистидин и (d) от 0,01 до 0,05% полисорбата 20.

В рамках настоящего изобретения антитело против FcRn является таким, как описано выше. Кроме того, фармацевтический состав может представлять собой водный состав, и он может представлять собой инъекционный жидкий состав. Кроме того, вышеупомянутый фармацевтический состав можно вводить подкожно.

Кроме того, было подтверждено, что фармацевтический состав является в высокой степени стабильным в условиях ускоренного тестирования. В частности, содержание агрегатов и фрагментов может составлять приблизительно 10% или менее в результате теста в течение 6 месяцев в условиях ускоренного тестирования (25°C, относительная влажность 60%). Кроме того, содержание агрегатов и фрагментов в описанных выше условиях может составлять приблизительно 9% или менее, приблизительно 8% или менее, приблизительно 7% или менее, приблизительно 6% или менее, приблизительно 5,5% или менее или приблизительно 5,0% или менее.

Кроме того, было подтверждено, что фармацевтический состав является в высокой степени стабильным даже в условиях длительного хранения. В частности, содержание агрегатов и фрагментов в условиях 5°C и 36 месяцев может составлять приблизительно 10% или менее. Кроме того, содержание агрегатов и фрагментов в описанных выше условиях может составлять приблизительно 9% или менее, приблизительно 8% или менее, приблизительно 7% или менее, приблизительно 6% или менее, приблизительно 5% или менее, приблизительно 4% или менее, приблизительно 3% или менее, приблизительно 2% или менее, приблизительно 1,8% или менее, приблизительно 1,5% или менее, или приблизительно 1,2% или менее.

Кроме того, фармацевтический состав может использоваться для лечения аутоиммунных заболеваний. В рамках настоящего изобретения аутоиммунное заболевание может быть любым, выбранным из группы, состоящей из миастении (MG), аутоиммунной офтальмопатии (TED), аутоиммунной гемолитической анемии с тепловыми антителами (WAIHA), оптического нейромиеелита (NMO), иммунной тромбоцитопенической пурпуры (ITP), пемфигуса обыкновенного (PV), хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (CIDP), волчаночного нефрита (LN) и мембранозной нефропатии (MN).

Скрининг состава, оптимизированного для HL161BKN

HL161BKN получали в концентрации приблизительно 210 мг/мл для каждого условия и хранили в течение 4 недель в условиях ускоренного испытания, составляющих 40°C, и проводили анализ концентрации (A280), мутности (A340), чистоты (SEC-ВЭЖХ, СЕХ-ВЭЖХ), вязкости, осмолярности, нерастворимых невидимых невооруженным глазом частиц (MFI) и т.п. для оценки стабильности образца и пригодности для подкожного введения.

Сначала проводили скрининговый тест 11 эксципиентов, которые часто используются в существующих антительных продуктах. В результате было подтверждено, что L-гистидин, гидрохлорид L-аргинина, L-глицин, D-сорбит и D-маннит имели эффект снижения образования агрегатов.

Синергический эффект тестировали путем комбинирования пяти выбранных эксципиентов. В результате, было подтверждено, что гидрохлорид L-аргинина снижал образование агрегатов на статистически значимом уровне ($p < 0,01$).

Путем комбинирования результатов сравнения величин эффектов на агрегаты и фрагментацию в качестве эксципиентов были отобраны L-гистидин и D-маннит. Кроме

того, в результате скрининга дополнительных эксципиентов, дополнительно был отобран L-метионин, который демонстрировал эффект снижения образования агрегатов. Кроме того, было подтверждено, что гистидин можно было использовать в качестве основного буфера. Кроме того, был выбран 0,02% полисорбат 20 высокой степени чистоты, который демонстрировал эффект ингибирования образования агрегатов при стрессе, вызванном перемешиванием, который может возникнуть в ходе хранения и транспортировки продукта.

Затем проводили первый тест для скрининга концентрации для выбранного гистидинового основного буфера и эксципиентов гидрохлорида L-аргинина, D-маннита и L-метионина. В данном случае, концентрация PBS20 была фиксированной и применялась на уровне 0,02%. В результате, была подтверждена высокая стабильность в условиях основного буфера на основе 50 мМ гистидина без эксципиентов. Кроме того, увеличение количества агрегатов и фрагментов в зависимости от условий эксципиентов не продемонстрировало значимых отличий, однако образование агрегатов снижалась по мере возрастания концентрации добавленного гидрохлорида L-аргинина.

С другой стороны, было подтверждено, что существовало небольшое отличие в зависимости от присутствия или отсутствия D-маннита и концентрации L-метионина. Таким образом, были выбраны гидрохлорид L-аргинина и 0,02% PSB20 в L-гистидиновом основном буфере в качестве состава для HL161BKN.

Наконец, для выбора оптимальных концентраций L-гистидина и гидрохлорида L-аргинина проводили второй скрининг концентраций с двумя партиями HL161BKN. В результате, увеличение количества агрегатов и фрагментов в зависимости от условий концентрации эксципиента не продемонстрировали значимых отличий, и было подтверждено, что измеренные величины вязкости и осмолярности во всех условиях составляли 20 сПз или менее и от 250 до 500 мосмоль/кг, что было пригодным для подкожного введения.

Кроме того, в результате проведения анализа нерастворимых невидимых невооруженным глазом частиц с использованием микропотоковой визуализации (MFI) для образцов, соответствующих каждому условию, были подтверждены условия, в которых увеличение количества нерастворимых невидимых невооруженным глазом частиц было наименьшим; и была проведена оценка стабильности и пригодности для введения путем подкожной (п/к) инъекции с использованием тестов чистоты (агрегаты и фрагменты), вязкости и осмолярности для выбора конечного состава.

В заключение, приблизительно 100 мМ L-гистидин, приблизительно 100 мМ гидрохлорид L-аргинина и приблизительно 0,02% полисорбат 20 (pH 6,0) были выбраны в качестве состава для неклинических испытаний и клинических испытаний фазы 1 для HL161BKN.

Далее настоящее изобретение более подробно описано с помощью примеров. Эти примеры приведены только для иллюстрации настоящего изобретения и специалистам в данной области будет понятно, что объем настоящего изобретения не следует истолковывать как ограниченный этими примерами.

I. Получение HL161BKN

Пример получения 1. Получение генной конструкции и вектора, содержащего ее, для получения антитела HL161

Для получения HL161BKN полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, вносили в вектор pCHO 1.0 (Life Technologies). Кроме того, полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4, кодирующую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, вносили в вектор pCHO 1.0.

Пример получения 2. Получение клеточной линии HL161BKN и продуцирование HL161BKN

Клетки CHO-S трансформировали с использованием экспрессирующего вектора, полученного согласно примеру получения 1, и подвергали процессу селекции с метотрексатом и пурамицином, а затем получали конечную продуцирующую клеточную линию. Полученную клеточную линию получали и хранили в качестве клеточного банка и использовали для продуцирования HL161BKN. Продуцирование антител проводили в биореакторе, содержащем культуральную среду (среда Dynamis+8 mM L-глутамин), путем добавления дополнительной среды (EFB+) каждые 2 суток, и супернатант выделяли после культивирования в течение приблизительно 15 суток. После этого подготавливали колонку с белком А и проводили инактивацию вируса при низком значении pH, а затем проводили анионообменную хроматографию (AEX) и катионообменную хроматографию (CEX). После этого, после концентрирования и замены буфера (ультрафильтрация/диафильтрация) проводили очистку стерильной фильтрацией. Качество образца продуцированного антитела подтверждали посредством анализа, такого как SEC-ВЭЖХ, CE-SDS, cIEF, ELISA, анализ эффективности и концентрации.

Пример получения 3. Анализ основных свойств HL161BKN

Проводили тест термической стабильности HL161BKN, тест стабильности в условиях ускоренного испытания в зависимости от pH, и тест растворимости. Для определения термической стабильности величины T_m анализировали посредством DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия), и для эксперимента в условиях ускоренного испытания для каждого значения pH проводили мониторинг степени образования агрегатов и фрагментов при хранении при 37°C в течение 1 месяца.

Для DSC для анализа величины T_m использовали оборудование Osong Hi-tech Medical Industry Promotion Foundation. Эксперименты проводили в диапазоне от 25°C до 100°C, и результаты подтверждали, как показано на фиг.1. Показана типичная гистограмма DSC для IgG1-типа, и подтверждены кривые в соответствии с CH-доменом и Fv-доменом. HL161BKN продемонстрировало высокую T_m 79,9°C, и анализ показал, что оно является термодинамически в высокой степени стабильным.

Кроме того, с использованием натрий цитратного-фосфатного буфера при pH 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0 получали HL161BKN в концентрации 10 мг/мл. После этого при хранении при

37°C в течение 4 недель подтверждали степень образования агрегатов или фрагментов с использованием SEC-ВЭЖХ. В результате, образование агрегатов или фрагментов возрастало по мере увеличения pH (фиг.2).

На основе этого результата, HL161BKN было получено в концентрации 100 мг/мл с использованием буферов, имевших низкую концентрацию или высокую концентрацию, которые имели низкое значение pH 5,0 и 6,0, а затем проводили испытание стабильности при хранении в течение 4 недель в условиях ускоренного испытания стабильности при 40°C. В результате, HL161BKN продемонстрировало тенденцию к тому, чтобы быть более стабильным в условиях низких значений pH, pH 5,0-6,0, и сохраняло высокий уровень мономера в целом во всех условиях.

Кроме того, для подтверждения растворимости HL161BKN, его концентрировали за 6 стадий до концентрации от 10 до 300 мг/мл, и образцы периодически отбирали и визуальное исследовали, и проводили анализ при A280 нм (концентрация), A340 нм (мутность) и чистоты посредством SEC-ВЭЖХ. В результате, было подтверждено, что мутность HL161BKN постепенно возрастала по мере возрастания его концентрации, однако происходило небольшое изменение чистоты мономеров при концентрации вплоть до 268 мг/мл.

II. Выбор состава, оптимизированного для HL161BKN

Пример получение 1. Скрининг состава, оптимизированного для HL161BKN

Целью этого эксперимента был выбор состава лекарственного вещества и лекарственного продукта для разработки продуктов для подкожного введения с высокой концентрацией HL161BKN. В этом эксперименте использовали три продуцированных партии: HL161BKN-B005, HL161BKN-B018 и HL161BKN-B021, и использованные реагенты и устройства являются следующими (таблица 3).

[Таблица 3]

Компоненты	Производитель
Дигидрат D-(+)-трегалозы	Sigma
D-маннит	Sigma
D-маннит	Avantor
D-сорбит	Sigma
Моногидрохлорид L-аргинина	Merck
Моногидрат моногидрохлорида L-гистидина	Merck
L-гистидин	Sigma
L-гистидин	Avantor
Полисорбат 20 (PSB20)	Sigma
Полисорбат 20 (PSB20)	Avantor
Полисорбат 80 (PSB80)	Merck

Хлорид натрия	Merck
Сахароза	Bioshop
Сахароза	Avantor
L-глицин	Merck
L-метионин	Avantor
Моногидрохлорид L-лизина	Tianjin Tianyao pharmaceuticals
L-валин	Evonik
Сульфат натрия безводный	Deajung
Хлорид аммония	Sigma
Лимонная кислота безводная	Avantor
Лимонная кислота безводная	Merck
Ацетонитрил	B&J
Тринатрий цитрат дигидрат	Merck
Тринатрий цитрат дигидрат	Avantor
1,5-мл центрифужная пробирка	Axygen
Amicon® ultra centricon, 15 мл	Millipore
Amicon® ultra centricon, 4 мл	Millipore

Устройства, использованные для тестирования этого состава, являются следующими (таблица 4).

[Таблица 4]

Устройства	Производитель	Каталожный номер
Центрифуга	Gyrogen	1580-MGR
Вискозиметр my-ROC	Rheosense	mv-ROC
Осмометр	Gonotec	Osmomat 3000
Камера температуры и влажности	Jeio tech	TH-TG-300
Nanodrop	Thermoscientific	Nanodrop2000
Propac WCX-10	Dionex	054993
TSK gel G3000SWXL	TOSOH	5788
Предколлонка TSK SWXL	TOSOH	8543
Водяная баня	Daihan	DH.WB000111
Waters alliance HPLC	Waters	E2695/2489
Смеситель MyLab intelli	MyLab	SLRM-3
Анализатор частиц MFI	ProteinSimple	4000-015-001

5200		
Программное обеспечение Stat-ease Design Expert®	Stat-ease	Version 7.0

Пример получения 2. Способ тестирования

Тест для выбора состава для HL161BKN в основном подразделялся на тесты скрининга эксципиентов и скрининга концентрации эксципиентов, и они были проведены. В частности, эксперимент проводили аналогично тому, как на фиг.3.

Пример 1. Скрининг эксципиентов

Пример 1.1. Тест эксципиентов

Были выбраны сахароза, D-трегалоза, D-маннит, D-сорбит, L-аргинин HCl, L-гистидин HCl, L-гистидин, L-глицин, полисорбат 20, полисорбат 80 и хлорид натрия (NaCl), которые являются 11 эксципиентами, которые часто используются в антительных продуктах, в настоящее время выпускаемых в продажу. В частности, тест эксципиентов проводили в 12 условиях буферов с использованием 5 мМ цитрата натрия (pH 6,0) в качестве основного буфера (таблица 5).

HL161BKN концентрировали до 1 мл или менее с использованием AMICON® (пороговое значение MM 30000), а затем буфер заменяли соответствующими буферными условиями для достижения конечной концентрации 210 мг/мл. Образцы для каждой условий получали в количестве от 0,3 до 0,5 мл, и хранили в 1,5-мл микроцентрифужных пробирках при 40°C в течение 4 недель. Взятие образцов проводили на 0 неделе, 2 неделе и 4 неделе для оценки изменений концентрации (A280), мутности (A340) и чистоты (SEC-ВЭЖХ, SEC-ВЭЖХ).

[Таблица 5]

[illegible]

Пример 1.2. Тест комбинаций эксципиентов

При комбинировании пяти эксципиентов (L-гистидин, гидрохлорид L-аргинина, L-глицин, D-сорбит и D-маннит), выбранных согласно примеру 1.1, подтверждали наличие синергического эффекта. В частности, было запланировано тестирование 17 условий по 2-уровневой факториальной (2^{n-1}) схеме с использованием программного обеспечения DOE (планирование экспериментов) (Stat-ease DESIGN-EXPERT®, версия 7.0) (таблица 6). В частности, проводили тестирование всего 12 условий: условия основного буфера 5 мМ цитрата натрия (pH 6,0) и 11 условий комбинаций эксципиентов. Кроме того, результаты тестов примера 1.1 использовали для пяти тестов с условиями только эксципиентов.

Способ тестирования проводили аналогично тому, как в примере 1.1, и далее определяли осмолярность буфера и образца для каждого условия, и проводили анализ ANOVA и вычисляли величины эффекта с использованием программного обеспечения DOE.

[Таблица 6]

Основной буфер	Концентрация HL161BKN (мг/мл)	Образец №	Эксципиенты (мМ)				
			His	Arg-HCl	Gly	Сорбит	Маннит
5 мМ цитрат Na (pH 6,0)	210	Контроль	-	-	-	-	-
		1	50	-	-	-	-
		2	-	50	-	-	-
		3	-	-	100	-	-
		4	-	-	-	250	-
		5	-	-	-	-	200
		6	50	-	100	250	-
		7	50	50	-	250	-
		8	50	50	100	-	-
		9	50	50	-	-	200
		10	50	-	100	-	200
		11		50	100	250	
		12	50	-	-	250	200
		13		50	100		200
		14	-	-	100	250	200
		15		50		250	200
		16	50	50	100	250	200

Пример 1.3. Тестирование дополнительного эксципиента

Проводили дополнительный анализ эксципиентов для тестирования состава

HL161BKN.

Проводили дополнительный тест L-метионина, о котором известно, что он имеет эффект сокращения ковалентных агрегатов; и тест замены основного буфера на основе цитрата натрия (pH 6,0), который может вызывать боль при инъекции, на гистидин (pH 6,0). Кроме того, когда используют PSB20 (полисорбат 20) низкого качества, содержащий много пероксида, стабильность антитела снижается вследствие окисления, так что для состава его заменяли на PSB20 высокого качества. После этого подтверждали эффект стресса при перемешивании при концентрации 0,02%, которую обычно используют для составления. Затем проводили скрининг эксципиента, способного снижать вязкость продукта с высокой концентрацией антитела.

Пример 1.3.1. Тест основного буфера на основе L-метионина и гистидина

Для подтверждения эффекта L-метионина и того, можно ли заменять основной буфер, 5 мМ цитрат натрия (pH 6,0), на гистидин (pH 6,0), проводили тестирование в шести условиях, приведенных в таблице 7. В случае основного буфера на основе гистидина, L-гистидин и гидрохлорид L-гистидина смешивали для достижения pH 6,0 и использовали. Способ тестирования выполняли аналогично тому, как в примере 1.1.

[Таблица 7]

Концентрация HL161BKN (мг/мл)	Условия	Буфер
210	1	5 мМ цитрат Na (pH 6,0)
	2	5 мМ цитрат Na, 50 мМ метионин (pH 6,0)
	3	5 мМ цитрат Na, 50 мМ гистидин (pH 6,0)
	4	5 мМ цитрат Na, 0,02% PSB мМ (pH 6,0)
	5	10 мМ гистидин (pH 6,0)
	6	50 мМ гистидин (pH 6,0)

Пример 1.3.2. Тест с полисорбатом 20 (PSB20)

Для подтверждения защитного эффекта PSB20 против стресса при перемешивании проводили тест в четырех условиях, приведенных в таблице 8. 0,5 мл соответствующих образцов, полученных аналогично примеру 1.1, помещали в 1,5-мл микроцентрифужную пробирку и устанавливали на смеситель MyLab intelli, и вращали при 10 об/мин при комнатной температуре в течение 1 недели, а затем проводили анализ концентрации, мутности и чистоты (SEC-ВЭЖХ).

[Таблица 8]

Целевая концентрация	Буфер	PSB20	Перемешивание
210	5 мМ цитрат Na (pH6.0)	-	-
		-	+

		0,02%	-
		0,02%	+

Пример 1.3.3. Скрининг эксципиентов в отношении снижения вязкости

Для разработки продуктов с высокой концентрацией HL161BKN для подкожного введения тестировали восемь эксципиентов, для которых общеизвестно, что они уменьшают вязкость. Проводили скрининговые тесты всего 9 эксципиентов с использованием 50 мМ гистидина (pH 6,0) в качестве основного буфера (таблица 9).

Образцы получали в количестве 1 мл для каждой условий аналогично примеру 1.1, и определяли вязкость при 25°C. Кроме того, оценивали изменения концентрации (A280) и чистоты (SEC-ВЭЖХ) для каждой условий при проведении 4-недельного ускоренного теста стабильности.

[Таблица 9]

Основной буфер	Концентрация HL161BKN (мг/мл)	Условия	8 эксципиентов							
			1	2	3	4	5	6	7	8
50 мм гистидин (pH 6,0)	210	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	100	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	100	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	100	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	100	-	-	-	-
		6	-	-	-	-	100	-	-	-
		7	-	-	-	-	-	100	-	-
		8	-	-	-	-	-	-	100	-
		9	-	-	-	-	-	-	-	100

Пример 1.4. Скрининг концентрации эксципиентов

Пример 1.4.1. Первый скрининг концентрации эксципиентов

Тест DOE по 2-уровневой факториальной (2^n) схеме был запланирован для 50 мМ гистидинового (pH 6,0) основного буфера, выбранного в примерах 1.1, 1.2 и 1.3, и трех эксципиентов (L-метионин, гидрохлорид L-аргинина и D-маннит) из четырех эксципиентов (L-метионин, гидрохлорид L-аргинина, D-маннит и PSB20), и проводили скрининг концентрации эксципиентов всего для 9 условий (таблица 10).

Эксперимент проводили аналогично примеру 1.1, и анализировали изменения концентрации (A280), мутности (A340), чистоты (SEC-ВЭЖХ, СЕХ-ВЭЖХ), вязкости и осмолярности.

[Таблица 10]

Условия	L-Met (мМ)	L-Arg-HCl (мМ)	D-маннит (мМ)	PSB20 (%)
1	-	-	-	-
2	50	50	0	0,02
3	10	100	0	0,02
4	10	50	100	0,02
5	10	100	100	0,02
6	50	100	100	0,02
7	50	50	100	0,02
8	50	100	0	0,02
9	10	50	0	0,02

Пример 1.4.2. Второй скрининг концентрации эксципиентов

Для исследования оптимальной концентрации гидрохлорида L-аргинина в конечном выбранном гистидиновом основном буфере и двух эксципиентов (гидрохлорид L-аргинина и PSB20), проводили 4-недельное ускоренное испытание стабильности при 40°C в четырех условиях с использованием двух партий HL161BKN B018 и B021 (таблица 11). Тест проводили аналогично примеру 1.1 и анализировали концентрацию (A280), мутность (A340), чистоту (SEC-ВЭЖХ, СЕХ-ВЭЖХ), вязкость, осмолярность и нерастворимые невидимые невооруженным глазом частицы (микропотоквая визуализация; MFI).

[Таблица 11]

Условия	L-гистидин (основной буфер) (мМ)	L-Arg-HCl (мМ)	PSB20 (%)	HL161BKN Партия №
1	50	100	0,02	B018
2	50	150	0,02	
3	100	100	0,02	
4	150	50	0,02	

1	50	100	0,02	B021
2	50	150	0,02	
3	100	100	0,02	
4	150	50	0,02	

Пример 2. Результаты скринингового теста эксципиентов

Пример 2.1. Результаты теста эксципиентов

Для оценки эффекта 11 эксципиентов, выбранных для скрининга эксципиентов, на стабильность образцов HL161BKN, проводили анализ концентрации, мутности, чистоты, агрегатов, фрагментов и зарядовых вариантов на 0 неделе, 2 неделе и 4 неделе в условиях ускоренного испытания при 40°C. Посредством этого анализа было отобрано 5 эксципиентов (гидрохлорид L-аргинина, L-гистидин, D-маннит, L-глицин и D-сорбит), которые имели хороший эффект ингибирования образования агрегатов и фрагментов.

Пример 2.1.1. Результаты анализа концентрации (A280) и мутности (A340)

Концентрация HL161BKN возрастала в течение 4 недель (таблица 12), что предположительно было результатом испарения буфера в условиях ускоренного испытания при 40°C.

[Таблица 12]

Эксперимент	0 неделя				2 неделя				4 неделя			
	Показатель OD340	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD340	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD340	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация
-	37,090	37,338	10	231,9	41,560	41,567	10	258,2	41,000	40,830	10	253,6
	37,435				41,547				40,747			
	37,489				41,594				40,744			
Гистидин	34,625	34,887	10	216,7	38,327	38,761	10	240,7	37,347	37,508	10	233,0
	34,901				38,999				37,580			
	35,136				38,956				37,596			
Гистидин HCl	35,391	35,220	10	218,8	35,938	35,735	10	222,0	38,122	38,222	10	237,4
	35,050				35,559				38,241			
	35,220				35,709				38,304			
Аргинин HCl	33,643	33,813	10	210,0	36,255	36,215	10	224,9	38,682	39,004	10	242,3
	33,697				36,278				39,231			
	34,098				36,113				39,100			
Трегалоза	33,000	32,923	10	204,5	33,704	33,671	10	209,1	34,474	34,704	10	215,6
	33,018				33,627				34,809			
	32,752				33,682				34,829			
Сорбит	34,590	34,938	10	217,0	36,956	37,086	10	230,3	38,396	38,591	10	239,7

	34,961				37,169				38,726			
	35,262				37,133				38,652			
Сахароза	33,079	33,120	10	205,7	39,543	39,259	10	244,5	39,865	40,004	10	248,5
	33,104				39,384				39,955			
	33,177				39,151				40,193			
Маннит	34,599	34,561	10	214,7	38,971	38,988	10	242,2	37,017	37,131	10	230,6
	34,613				38,879				37,034			
	34,471				39,114				37,341			
Глицин	33,782	33,608	10	208,7	30,015	30,159	10	187,3	36,080	36,265	10	225,2
	33,296				30,141				36,338			
	33,745				30,320				36,377			
PSB20	36,778	36,623	10	227,5	38,696	39,312	10	244,2	41,305	40,944	10	254,3
	36,524				39,574				40,330			
	36,567				39,666				41,196			
PSB80	32,287	32,284	10	200,5	36,254	36,183	10	224,7	45,823	45,692	10	283,8
	32,445				36,103				45,721			
	32,119				36,193				45,533			
NaCl	30,704	30,708	10	190,7	32,691	32,658	10	202,8	34,538	34,592	10	214,9
	30,679				32,757				34,708			
	30,741				32,597				34,530			

С другой стороны, мутность не возрастала в большинстве условий или величина изменения составляла 0,020 или менее. Однако было обнаружено, что визуально присутствовала мутность в условиях PSB20, и было подтверждено, что мутность (A340) также значительно возрастала (таблица 13).

[Таблица 13]

Условия №	Экципиенты	Мутность (A340)			
		Неделя 0	Неделя 2	Неделя 4	$\Delta A340 (W4-W0)$
1	-	0,125	0,122	0,145	0,020
2	Сахароза	0,211	0,166	0,167	-0,044
3	D-трегалоза	0,127	0,099	0,098	-0,029
4	D-маннит	0,184	0,111	0,113	-0,071
5	D-сорбит	0,129	0,106	0,115	-0,014
6	L-аргинин- HCl	0,142	0,095	0,101	-0,041
7	L-гистидин- HCl	0,149	0,108	0,130	-0,019
8	L-гистидин	0,118	0,112	0,124	0,006
9	L-глицин	0,142	0,100	0,113	-0,029
10	PSB20	0,166	1,159	1,260	1,094
11	PSB80	0,266	0,324	0,275	0,009
12	NaCl	0,162	0,119	0,142	-0,020

Пример 2.1.2. Результаты анализа агрегатов и фрагментов

SEC-ВЭЖХ использовали для сравнения и оценки увеличения количества агрегатов и фрагментов для каждой условий эксципиентов (таблица 14). По сравнению с условиями основного буфера, гидрохлорид L-аргинина, L-гистидин, гидрохлорид L-гистидина, D-маннит, L-глицин и D-сорбит эффективно ингибировали образование агрегатов. Кроме того, 0,2% PSB20, 0,2% PSB80 и NaCl в большей степени увеличивали образование агрегатов. Кроме того, L-гистидин, гидрохлорид L-гистидина, гидрохлорид L-аргинина и L-глицин представляли собой эксципиенты, ингибирующие образование фрагментов, и NaCl увеличивал образование фрагментов (таблица 14 и фиг.4).

[Таблица 14]

Услов ия №	Эксципиен ты	Относительная чистота (мономер)			Изменения на неделе 2 (W2-W0)		Изменения на неделе 4 (W4-W0)	
		Недел я 0	Недел я 2	Недел я 4	Δ агрегат	Δ фрагмен	Δ агрегат	Δ фрагмен

					ы	ты	ы	ты
1	-	100,0	92,1	84,4	4,3	2,9	10,0	4,3
2	Сахароза	100,0	93,6	87,3	3,3	2,5	7,6	3,9
3	D-трегалоза	100,0	94,9	90,6	2,2	2,5	4,5	4,1
4	D-маннит	100,0	95,1	91,5	1,9	2,6	3,6	4,2
5	D-сорбит	100,0	94,9	91,4	2,0	2,7	3,8	4,0
6	L-аргинин-HCl	100,0	97,5	96,7	0,2	2,1	0,1	3,0
7	L-гистидин-HCl	100,0	96,1	94,7	2,0	1,7	2,3	2,7
8	L-гистидин	100,0	95,8	94,7	2,0	1,8	2,0	2,5
9	L-глицин	100,0	96,2	93,2	1,6	1,9	3,6	2,7
10	PSB20	100,0	95,9	84,0	0,9	2,8	10,5	4,0
11	PSB80	100,0	83,5	81,5	12,5	2,4	13,0	3,7
12	NaCl	100,0	86,6	70,7	8,2	4,0	20,1	6,5

Пример 2.1.3. Результаты анализа зарядовых вариантов

Паттерн изменений зарядовых вариантов HL161BKN в соответствии с каждым условием эксципиентов подтверждали с использованием СЕХ-ВЭЖХ. В результате, не наблюдалось отчетливых изменений зарядовых вариантов. Однако основной пик был значительно снижен для условий PSB20 и NaCl (фиг.5). Это было ожидаемым в результате увеличенного количества агрегатов.

Пример 2.2. Результаты теста комбинирования эксципиентов

Оценивали эффект комбинирования пяти эксципиентов, выбранных в тесте эксципиентов примера 1.1, на стабильность образца HL161BKN. В частности, проводили 4-недельный тест в условиях ускоренного испытания при 40°C, и были отобраны гидрохлорид L-аргинина, L-гистидин и D-маннит, которые эффективно ингибировали образование агрегатов и фрагментов.

Для подтверждения наличия у эксципиентов, выбранных посредством скринингового теста эксципиентов, синергического эффекта путем комбинирования, был запланирован тест условий с использованием программного обеспечения для планирования экспериментов (DOE). Проводили тесты всего 12 условий, включая условия основного буфера и условия комбинации 11 эксципиентов. Результаты теста примера 1.1 использовали для теста условий пяти эксципиентов отдельно (таблица 15).

Когда результаты сравнения величины изменения уровня агрегатов анализировали

посредством ANOVA, был выявлен эксципиент, который снижал образование агрегатов на статистически значимом уровне ($p < 0,01$). Однако отсутствовали эксципиенты, которые снижали образование фрагментов на статистически значимом уровне.

С другой стороны, в случае HL161BKN, паттерн образования агрегатов различался в зависимости от комбинации эксципиентов, однако не было синергического эффекта комбинирования эксципиентов. Типы эксципиентов были выбраны посредством анализа ANOVA и сравнительного ранжирования величин эффекта.

[Таблица 15]

Условия №	L-гистидин	L-Arg HCl	L-глицин	D-сорбит	D-маннит	Тест
	50 mM	50 mM	100 mM	250 mM	200 mM	
1	-1	-1	-1	-1	1	X
2	1	-1	1	1	-1	O
3	1	1	-1	1	-1	O
4	1	-1	-1	-1	-1	X
5	1	1	1	-1	-1	O
6	-1	1	-1	-1	-1	X
7	-1	-1	-1	1	-1	X
8	1	1	-1	-1	1	O
9	1	-1	1	-1	1	O
10	1	1	1	1	1	O
11	1	-1	-1	1	1	O
12	-1	1	1	-1	-1	O
13	-1	-1	1	1	1	O
14	-1	1	1	1	-1	O
15	-1	1	-1	1	1	O
16	-1	-1	1	-1	-1	X
17	-1	-1	-1	-1	-1	O

Пример 2.2.1. Результаты анализа концентрации (A280) и мутности (A340)

Концентрация HL161BKN возрастала в течение 4 недель, что предположительно было следствием испарения буфера в условиях ускоренного испытания при 40°C (таблица 16). С другой стороны, мутность не повышалась и продемонстрировала небольшое увеличение до 0,054 или менее (таблица 17).

[Таблица 16]

Условия	0 неделя				2 неделя				4 неделя			
	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация
2	36,559	36,471	10	226,5	36,286	36,333	10	225,7	38,797	39,513	10	245,4
	36,505				36,411				39,767			
	36,349				36,301				39,976			
3	34,230	34,367	10	213,5	37,192	37,215	10	231,2	37,316	37,342	10	231,9
	34,393				37,254				37,534			
	34,477				37,200				37,177			
5	35,852	35,860	10	222,7	38,200	38,062	10	236,4	37,938	37,988	10	236,0
	35,768				38,003				37,875			
	35,961				37,984				38,151			
8	33,291	33,364	10	207,2	36,967	37,044	10	230,1	38,593	38,709	10	240,4
	33,395				37,064				38,919			
	33,406				37,102				38,616			
9	34,744	34,872	10	216,6	36,676	36,908	10	229,2	37,359	37,306	10	231,7
	34,994				37,078				37,507			
	34,877				36,971				37,053			
10	35,955	35,986	10	223,5	36,084	36,158	10	224,6	37,998	38,015	10	236,1

	36,051				36,124				37,981			
	35,952				36,265				38,067			
11	34,664	34,419	10	213,8	36,009	36,020	10	223,7	36,216	36,293	10	225,4
	34,410				35,972				36,272			
	34,182				36,080				36,391			
12	35,834	35,976	10	223,5	36,878	36,956	10	229,5	39,354	39,027	10	242,4
	36,063				37,016				38,856			
	36,031				36,973				38,872			
13	34,637	34,713	10	215,6	39,294	39,173	10	243,3	38,173	38,248	10	237,6
	34,706				38,945				38,372			
	34,797				39,280				38,199			
14	34,242	34,259	10	212,8	38,398	38,458	10	238,9	35,047	35,016	10	217,5
	34,401				38,349				35,041			
	34,134				39,628				34,959			
15	34,681	34,769	10	216,0	34,802	34,916	10	216,9	37,212	37,332	10	231,9
	34,761				34,819				37,388			
	34,865				35,128				37,397			
17	36,082	36,074	10	224,1	38,488	38,520	10	239,3	41,257	41,353	10	256,8
	36,121				38,548				41,370			
	36,019				38,525				41,431			

[Таблица 17]

Условия	0 неделя		2 неделя		4 неделя	
	Показатель OD340	Среднее значение	Показатель OD340	Среднее значение	Показатель OD340	Среднее значение
2	0,120	0,119	0,105	0,105	0,140	0,141
	0,117		0,104		0,143	
	0,121		0,106		0,141	
3	0,102	0,101	0,104	0,106	0,126	0,121
	0,101		0,108		0,118	
	0,099		0,106		0,119	
5	0,113	0,106	0,133	0,131	0,161	0,160
	0,102		0,129		0,158	
	0,103		0,131		0,160	
8	0,090	0,090	0,105	0,107	0,120	0,121
	0,093		0,107		0,121	
	0,086		0,108		0,122	
9	0,103	0,103	0,111	0,112	0,140	0,141
	0,103		0,110		0,141	
	0,104		0,114		0,143	
10	0,099	0,098	0,114	0,112	0,132	0,133
	0,097		0,109		0,134	
	0,099		0,112		0,133	
11	0,104	0,102	0,117	0,116	0,136	0,136
	0,101		0,117		0,137	
	0,101		0,114		0,135	
12	0,110	0,104	0,096	0,096	0,099	0,101
	0,102		0,097		0,102	
	0,100		0,095		0,101	
13	0,112	0,110	0,100	0,099	0,098	0,099
	0,110		0,099		0,101	
	0,107		0,097		0,097	
14	0,101	0,098	0,108	0,106	0,143	0,142
	0,098		0,107		0,141	
	0,096		0,104		0,142	

15	0,107	0,105	0,099	0,099	0,117	0,117
	0,105		0,102		0,117	
	0,102		0,097		0,117	
17	0,122	0,119	0,106	0,104	0,114	0,115
	0,118		0,104		0,116	
	0,116		0,103		0,114	

Пример 2.2.2. Результаты анализа агрегатов и фрагментов

SEC-ВЭЖХ использовали для сравнения и оценки величины увеличения уровня агрегатов и фрагментов для каждого условия комбинирования эксципиентов (таблица 18 и фиг.7). Кроме того, данные SEC-ВЭЖХ всего для 17 условий, включая тест условий только эксципиентов согласно примеру 1.1, анализировали посредством ANOVA. В результате, было подтверждено, что гидрохлорид L-аргинина снижал образование агрегатов на статистически значимом уровне ($p < 0,01$) (фиг.6), и отсутствовал эксципиент, который снижал образование фрагментов на статистически значимом уровне.

Кроме того, в результате сравнения величин эффекта на агрегацию и фрагментацию было подтверждено, что образование агрегатов и фрагментов HL161BKN снижалось, когда в качестве эксципиентов использовали L-гистидин, D-маннит и D-сорбит. Однако не было синергического эффекта между эксципиентами. D-маннит и D-сорбит являются изомерами, и из них был выбран D-маннит, который используется часто (фиг.8).

[Таблица 18]

Условия №	Эксципиенты	Относительная чистота (мономер)			Изменения на неделе 2 (W2-W0)		Изменения на неделе 4 (W4-W0)	
		Неделя 0	Неделя 2	Неделя 4	Δ агрегаты	Δ фрагменты	Δ агрегаты	Δ фрагменты
2	H+S+G	100,0	95,7	95,7	2,3	1,8	1,8	2,2
3	H+A+S	100,0	95,9	96,5	2,1	1,8	1,1	2,2
5	H+A+G	100,0	95,2	95,1	2,3	2,2	2,1	2,5
8	H+A+M	100,0	96,5	97,2	1,4	1,8	0,4	2,3
9	H+M+G	100,0	95,4	95,8	2,5	1,9	1,8	2,2
10	H+A+S+M+G	100,0	95,9	96,2	2,1	1,7	1,3	2,3
11	H+S+M	100,0	95,7	95,7	2,2	1,8	1,9	2,1
12	A+M+G	100,0	96,7	96,3	1,1	2,0	0,9	2,5
13	S+M+G	100,0	96,6	96,6	1,1	2,0	0,7	2,4
14	A+S+G	100,0	97,5	94,7	0,0	2,3	0,6	4,3

15	A+S+M	100,0	96,9	97,2	0,6	2,2	-0,4	3,0
17	(-) Контроль	100,0	92,6	88,9	4,1	2,7	6,6	3,6

* A: 50 мМ гидрохлорид L-аргинина, H: 50 мМ L-гистидин, G: 100 мМ L-глицин, M: 200 мМ D-маннит, S: 250 мМ D-сорбит

Пример 2.2.3. Результаты анализа зарядовых вариантов

Паттерн изменений зарядовых вариантов HL161BKN в зависимости от условий комбинирования эксципиентов подтверждали с использованием СЕХ-ВЭЖХ. В результате, не наблюдали заметных изменений зарядовых вариантов (основные и кислотные варианты) (фиг.9).

Пример 2.2.4. Результаты анализа вязкости и осмолярности

В результате измерения вязкости для каждого условия эксципиентов было подтверждено, что вязкость снижалась при добавлении гидрохлорида L-аргинина. Осмолярность увеличивалась по мере увеличения количества и концентрации добавленных эксципиентов. В частности, было подтверждено, что добавление 50 мМ гидрохлорида L-аргинина, 50 мМ L-гистидина и 100 мМ L-глицина увеличивало осмолярность приблизительно на 100 мосмоль/кг, соответственно; добавление 200 мМ D-маннита увеличивало осмолярность приблизительно на 200 мосмоль/кг; и добавление 250 мМ D-сорбита увеличивало осмолярность приблизительно на 250 мосмоль/кг (таблица 19).

Как правило, осмолярность подкожных инъекций является сходной с осмолярностью организма (приблизительно 290 мосмоль/кг) и регулируется в диапазоне приблизительно от 250 до 500 мосмоль/кг (РСТ/ЕР2009/066675). Таким образом, было определено, что осмолярность буфера состава должна регулироваться в диапазоне приблизительно от 220 до 450 мосмоль/кг с учетом концентрации HL161BKN. Таким образом, было решено провести следующий тест для скрининга концентраций эксципиентов с учетом диапазона осмолярности.

[Таблица 19]

Условия №	Эксципиенты	Вязкость (сПз, 25°C)		Осмолярность (мосмоль/кг)	
		Буфер	Образец	Буфер	Образец
2	H+S+G	1,066	N/A	498	683
3	H+A+S	1,052	16,700	485	617
5	H+A+G	0,925	19,641	320	395
8	H+A+M	1,002	15,941	434	549
9	H+M+G	1,021	14,807	451	593
10	H+A+S+M+G	1,198	27,865	831	1103
11	H+S+M	1,465	23,680	631	850

12	A+M+G	1,250	39,732	425	560
13	S+M+G	1,055	22,291	471	613
14	A+S+G	1,358	32,547	606	814
15	A+S+M	1,199	19,176	607	788
17	(-) Контроль	1,115	57,890	23	37

* A: 50 mM гидрохлорид L-аргинина, H: 50 mM L-гистидин, G: 100 mM L-глицин, M: 200 mM D-маннит, S: 250 mM D-сорбит

Пример 2.3. Результаты теста дополнительных эксципиентов

Проводили дополнительный тест эксципиентов. В результате, 50 mM гистидин (pH 6,0) использовали в качестве основного буфера, и в качестве дополнительных эксципиентов были выбраны L-метионин, который имел эффект ингибирования образования агрегатов, и 0,02% PSB20, который ингибировал образование агрегатов в условиях стресса, вызванного перемешиванием.

Пример 2.3.1. Результаты теста основного буфера с L-метионином и гистидином

1) Результаты анализа концентрации (A280) и мутности (A340)

Концентрация HL161BKN возрастала в течение 4 недель, что предположительно было следствием испарения буфера в условиях ускоренного испытания при 40°C (таблица 20). Мутность не повышалась или продемонстрировала небольшое увеличение на вплоть до 0,1 или менее (таблица 21).

[Таблица 20]

Условия	T0				T2				T4			
	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация
10 мМ цитрат Na, pH 6	33,102	33,179	10	206,1	37,997	38,120	10	236,8	34,364	34,382	10	213,6
	33,293				37,989				34,337			
	33,143				38,374				34,446			
10 мМ цитрат Na, 50 мМ метионин, pH 6	32,352	32,289	10	200,6	34,964	34,778	10	216,0	33,135	33,026	10	205,1
	32,215				34,658				33,137			
	32,301				34,712				32,805			
10 мМ цитрат Na, 50 мМ гистидин- HCl, pH 6	35,852	35,817	10	222,5	40,067	40,309	10	250,4	38,534	38,685	10	240,3
	35,773				40,413				38,776			
	35,826				40,447				38,746			
10 мМ цитрат Na, 0,02% PSB20,	33,336	33,529	10	208,3	37,538	37,818	10	234,9	33,866	33,795	10	209,9
	33,572				37,905				33,662			
	33,678				38,012				33,857			

pH 6												
10 мМ гистидин, pH 6	32,976	32,987	10	204,9	37,096	37,358	10	232,0	37,282	37,254	10	231,4
	33,024				37,358				37,246			
	32,960				37,619				37,234			
50 мМ гистидин, pH 6	33,019	32,937	10	204,6	37,23	37,071	10	230,3	39,888	39,889	10	247,8
	32,837				37,024				40,019			
	32,954				36,959				39,761			

[Таблица 21]

Условия	T0		T2		T4	
	Показатель OD340	Среднее значение	Показатель OD340	Среднее значение	Показатель OD340	Среднее значение
10 mM цитрат Na, pH 6	0,110	0,111	0,116	0,116	0,127	0,125
	0,115		0,117		0,124	
	0,109		0,114		0,124	
10 mM цитрат Na, 50 mM метионин, pH 6	0,112	0,112	0,100	0,101	0,103	0,103
	0,115		0,106		0,104	
	0,108		0,098		0,103	
10 mM цитрат Na, 50 mM гистидин- HCl, pH 6	0,111	0,108	0,118	0,119	0,135	0,135
	0,107		0,122		0,136	
	0,105		0,117		0,134	
10 mM цитрат Na, 0,02% PSB20, pH 6	0,114	0,115	0,123	0,120	0,123	0,123
	0,115		0,119		0,123	
	0,116		0,117		0,122	
10 mM гистидин, pH 6	0,102	0,103	0,116	0,116	0,149	0,146
	0,108		0,118		0,143	
	0,100		0,115		0,146	
50 mM гистидин, pH 6	0,097	0,095	0,125	0,123	0,153	0,152
	0,096		0,122		0,152	
	0,092		0,123		0,150	

2) Результаты анализа агрегатов и фрагментов

По сравнению с условиями основного буфера L-метионин продемонстрировал превосходный эффект ингибирования образования агрегатов. Кроме того, отсутствовало повышение образования агрегатов в случае 0,02% PSB20. Кроме того, результаты условий, в которых L-гистидин добавляли в качестве эксципиента, были сходными с условиями, в которых его использовали в качестве основного буфера, и образование агрегатов снижалось в условиях 50 mM гистидина по сравнению с условиями 10 mM гистидина (таблица 22 и фиг.10).

[Таблица 22]

Условия №	Относительная чистота (мономер)			Изменения на неделе 2 (W2-W0)		Изменения на неделе 4 (W4-W0)	
	Неделя 0	Неделя 2	Неделя 4	Δ агрегаты	Δ фрагменты	Δ агрегаты	Δ фрагменты
1	100,0	90,1	82,5	5,1	3,9	9,9	6,0
2	100,0	95,7	92,4	2,2	1,8	4,3	2,7
3	100,0	95,1	93,9	2,7	1,9	3,0	2,7
4	100,0	88,8	83,5	5,8	4,4	7,7	7,2
5	100,0	94,4	91,9	3,3	1,9	4,4	3,1
6	100,0	96,2	95,1	1,8	1,7	1,8	2,8

3) Результаты анализа зарядовых вариантов

В результате анализа СЕХ-ВЭЖХ не наблюдали явных изменений зарядовых вариантов (основные и кислотные варианты) (фиг.11).

Пример 2.3.2. Результаты теста с полисорбатом 20

1) Результаты анализа концентрации (A280) и мутности (A340)

В результате теста с перемешиванием при комнатной температуре происходило небольшое изменение концентрации. Образец, который перемешивали без PSB20, оказался белым визуально и мутность нельзя было определить (фиг.12). С другой стороны, образец с PSB20 был визуально несколько мутным в условиях перемешивания, и мутность увеличилась приблизительно на 0,227 (таблица 23).

Посредством этого было подтверждено, что PSB20 имеет эффект защиты HL161BKN в высокой концентрации от стресса, вызванного перемешиванием.

[Таблица 23]

PSB20	Перемешивание	Относительная чистота (мономер)			Мутность (A340)		
		Неделя 0	Неделя 1	Δконц. (W1-W0)	Неделя 0	Неделя 1	Δконц. (W1-W0)
-	-	206,1	206,6	0,5	0,111	0,115	0,004
-	+	206,1	NA*	NA	0,111	NA	NA
0,02%	-	208,3	197,4	-10,9	0,115	0,126	0,011
0,02%	+	208,3	212,3	4,0	0,115	0,342	0,227

*NA не применимо

2) Результаты анализа агрегатов и фрагментов

Образование агрегатов увеличивалось посредством стресса, вызванного перемешиванием, и было подтверждено, что PSB20 имел эффект ингибирования

образования агрегатов. С другой стороны, не происходило повышения уровня фрагментов вследствие стресса, вызванного перемешиванием (таблица 24 и фиг.13).

[Таблица 24]

PSB20	Перемешивание	Относительная чистота (мономер)		Неделя 1 (W1-W0)	
		Неделя 0	Неделя 1	ΔАгрегаты	ΔФрагменты
-	-	100,0	94,7	4,6	0,2
-	+	100,0	NA	NA	NA-
0,02%	-	100,0	94,3	5,0	0,2
0,02%	+	100,0	90,6	8,3	0,2

*NA не применимо

Пример 2.3.3. Результаты скрининга эксципиента в отношении снижения вязкости

1) Результаты анализа концентрации (A280) и вязкости

Концентрация HL161BKN возрастала в течение 4 недель (таблица 25), что предположительно было следствием испарения буфера в условиях ускоренного испытания при 40°C. Когда добавляли гидрохлорид L-гистидина, гидрохлорид L-аргинина и L-глицин, вязкость снижалась по сравнению с условиями 1, однако эффект, таким образом, был незначимым. С другой стороны, в случае гидрохлорида L-лизина, NaCl, Na₂SO₄ и NH₄Cl, вязкость значительно увеличивалась (таблица 26).

[Таблица 25]

Условия			0 неделя				2 неделя				4 неделя			
			Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация
210 мг/ мл	1	50 мМ гистидин, pH 6	33,850	33,934	10	210,8	38,622	38,502	10	239,1	41,008	41,277	10	256,4
			33,922				38,514				41,264			
			34,031				38,369				41,559			
	2	50 мМ гистидин, 100 мМ His- HCl, pH 6	32,763	32,539	10	202,1	35,180	35,132	10	218,2	38,764	38,979	10	242,1
			32,386				35,054				39,112			
			32,469				35,161				39,061			
	3	50 мМ гистидин, 100 мМ глицин, pH 6	32,403	32,500	10	201,9	36,711	36,544	10	227,0	36,376	36,440	10	226,3
			32,556				36,893				36,527			
			32,541				36,028				36,418			

	4	50 мМ	32,554	32,619	10	202,6	37,297	37,092	10	230,4	36,304	36,403	10	226,1
		гистид	32,649				36,950				36,488			
		ин, 100 мМ	32,655				37,028				36,418			
		Arg- HCl, pH 6												
		50 мМ	33,940				37,492				40,240			
		гистид	34,269				37,509				40,916			
		ин, 100 мМ	33,870				37,471				40,733			
		лизин- HCl, pH 6												
	6	50 мМ	35,426	35,637	10	221,3	38,475	38,518	10	239,2	37,653	37,850	10	235,1
		гистид	35,763				38,581				38,070			
		ин, 100 мМ	35,722				38,499				37,828			
		валин, pH 6												
		50 мМ	35,017				37,585				39,127			
		гистид	35,230				37,434				39,621			
	7	ин, 100	34,743				37,707				39,428			

		мМ NH ₄ Cl, pH 6												
	8	50 мМ гистид ин, 100 мМ NaCl, pH 6	35,734	35,647	10	221,4	37,912	37,844	10	235,1	38,064	38,115	10	236,7
			35,597				37,807				38,364			
			35,611				37,812				37,917			
	9	50 мМ гистид ин, 100 мМ Na ₂ SO ₄ , pH 6	35,553	35,655	10	221,5	35,367	35,383	10	219,8	36,862	37,118	10	230,5
			35,792				35,440				37,310			
			35,620				35,343				37,191			

[Таблица 26]

Условия №	Экципиенты	Вязкость (сПз, 25°C)	
		Буфер	Образец
1	-	1,047	19,723
2	L-His HCl	1,240	18,487
3	L-Lys HCl	1,101	26,472
4	L-Arg HCl	1,105	17,768
5	L-глицин	1,070	17,716
6	L-валин	1,086	20,753
7	NaCl	0,980	25,620
8	Na ₂ SO ₄	1,088	24,135
9	NH ₄ Cl	1,049	30,414

2) Результаты анализа агрегатов и фрагментов

Агрегаты и фрагменты анализировали посредством анализа SEC-ВЭЖХ. В результате, когда добавляли гидрохлорид L-гистидина и гидрохлорид L-аргинина, образовывалось относительно мало агрегатов по сравнению с условиями 1, и ни один из эксципиентов не снижал образование фрагментов (таблица 27 и фиг.14).

[Таблица 27]

Услов ия №	Эксципиен ты	Относительная чистота (мономер)			Изменения на неделе 2 (W2-W0)		Изменения на неделе 4 (W4-W0)	
		Недел я 0	Недел я 2	Недел я 4	Δ агрегат ы	Δ фрагмен ты	Δ агрегат ы	Δ фрагмен ты
1	-	100,0	92,4	89,4	5,2	2,2	6,9	3,3
2	L-His HCl	100,0	94,4	92,4	3,0	2,4	3,9	3,5
3	L-Lys HCl	100,0	93,7	92,1	3,8	2,3	4,5	3,1
4	L-Arg HCl	100,0	94,6	92,8	3,0	2,2	3,8	3,2
5	L-глицин	100,0	93,7	91,7	3,9	2,2	4,9	3,2
6	L-валин	100,0	93,6	92,2	3,9	2,3	4,4	3,1
7	NaCl	100,0	93,2	91,4	4,2	2,4	5,3	3,1
8	Na ₂ SO ₄	100,0	94,1	92,3	3,6	2,2	4,4	3,0
9	NH ₄ Cl	100,0	93,4	91,6	4,1	2,3	4,8	3,3

Пример 2.4. Результаты скрининга концентрации эксципиентов

Пример 2.4.1. Результаты первого скрининга концентрации эксципиентов

Для скрининга концентрации гистидинового основного буфера (pH 6,0), выбранного в примере 1.3, выше, и трех эксципиентов (L-метионин, гидрохлорид L-аргинина и D-

маннит) в 0,02% PSB20, проводили всего в 9 условиях (таблица 28). В результате, в качестве эксципиентов были выбраны гидрохлорид L-аргинина и PSB20, в дополнение к гистидиновому основному буферу.

[Таблица 28]

Условия №	L-Met (мМ)	L-Arg HCl (мМ)	D-маннит (мМ)	PSB20 (%)
1	-	-	-	-
2	50	50	0	0,02
3	10	100	0	0,02
4	10	50	100	0,02
5	10	100	100	0,02
6	50	100	100	0,02
7	50	50	100	0,02
8	50	100	0	0,02
9	10	50	0	0,02

1) Результаты анализа концентрации (A280) и мутности (A340)

Концентрация HL161BKN возрастала в течение 4 недель приблизительно на 15%, что предположительно было следствием испарения буфера в условиях ускоренного испытания при 40°C (таблица 29). Мутность в каждом из условий продемонстрировала только незначимое увеличение, в среднем составившее приблизительно 0,048 (таблица 30).

[Таблица 29]

Условия			0 неделя				2 неделя				4 неделя			
			Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация
210 мг/ мл	1	50 мМ гистидин, pH 6	34,818	34,573	10	215,4	40,515	40,787	10	253,3	39,391	39,579	10	245,8
			34,770				40,963				39,619			
			34,432				40,883				39,726			
	2	50 мМ гистидин, 50 мМ метионин, 50 мМ Arg- HCl, pH 6	35,636	35,605	10	221,1	41,353	41,430	10	257,3	40,936	41,245	10	256,2
			35,538				41,565				41,451			
			36,641				41,372				41,349			
	3	50 мМ гистидин, 10	33,558	33,430	10	207,6	36,078	36,064	10	224,0	34,138	34,161	10	212,2
			33,443				36,145				34,256			
			33,289				35,968				34,088			

		мМ метионин, 100 мМ Arg- HCl, pH 6											
4	50 мМ гистидин, 10 мМ метионин, 50 мМ Arg- HCl, 100 мМ маннит , pH 6	36,486 36,690 36,393	36,523	10	226,9	40,730 40,785 40,857	40,791	10	253,4	40,325 40,367 39,965	40,219	10	249,8
5	50 мМ гистидин, 10 мМ	36,410 36,131 36,467	36,336	10	225,7	36,240 36,256 36,266	36,254	10	225,2	37,971 38,410 38,243	38,208	10	237,3

		метионин, 100 мМ Arg-HCl, 100 мМ маннит, pH 6											
6	50 мМ гистидин, 50 мМ метионин, 100 мМ Arg-HCl, 100 мМ маннит, pH 6	35,108 35,132 35,136	35,125	10	218,2	39,423 39,749 39,752	39,641	10	246,2	41,750 41,992 42,027	41,923	10	260,4
7	50 мМ гистидин, 50 мМ метионин, 100 мМ Arg-HCl, 100 мМ маннит, pH 6	36,423 36,555 36,759	36,579	10	227,2	39,168 39,018 39,144	39,110	10	242,9	43,308 42,800 42,985	43,031	10	267,3

		мМ метионин, 50 мМ Arg- HCl, 100 мМ маннит , pH 6											
8	50 мМ гистидин, 50 мМ метионин, 100 мМ Arg- HCl, pH 6	34,828 35,124 35,292	35,081	10	217,9	35,673 35,967 36,146	35,929	10	223,2	37,477 37,909 37,779	37,722	10	234,4
9	50 мМ гистидин, 10 мМ	31,656 31,604 31,615	31,625	10	196,4	35,713 35,884 35,951	35,849	10	222,7	34,000 34,226 34,084	34,103	10	211,8

[illegible]

[Таблица 30]

Условия			0 неделя		2 неделя		4 неделя	
			Показатель OD340	Среднее значение	Показатель OD340	Среднее значение	Показатель OD340	Среднее значение
210 мг/мл	1	50 mM гистидин, pH 6	0,148	0,147	0,170	0,170	0,189	0,191
			0,146		0,169		0,191	
			0,147		0,170		0,192	
	2	50 mM гистидин, 50 mM метионин, 50 mM Arg-HCl, pH 6	0,145	0,143	0,186	0,182	0,194	0,193
			0,143		0,183		0,191	
			0,141		0,178		0,193	
	3	50 mM гистидин, 10 mM метионин, 100 mM Arg-HCl, pH 6	0,124	0,123	0,167	0,164	0,180	0,178
			0,122		0,161		0,178	
			0,123		0,165		0,175	
	4	50 mM гистидин, 10 mM метионин, 50 mM Arg-HCl, 100 mM маннит, pH 6	0,149	0,147	0,183	0,181	0,202	0,199
			0,148		0,179		0,198	
			0,145		0,182		0,197	
	5	50 mM гистидин, 10 mM метионин	0,134	0,134	0,173	0,172	0,185	0,184
			0,132		0,172		0,184	
			0,135		0,172		0,184	

	н, 100 мМ Arg- HCl, 100 мМ маннит, pH 6						
6	50 мМ гистидин , 50 мМ метиони н, 100 мМ Arg- HCl, 100 мМ маннит, pH 6	0,132 0,133 0,134	0,133	0,172 0,170 0,174	0,172	0,191 0,191 0,188	0,190
7	50 мМ гистидин , 50 мМ метиони н, 50 мМ Arg-HCl, 100 мМ маннит, pH 6	0,159 0,160 0,162	0,160	0,180 0,175 0,180	0,178	0,192 0,196 0,193	0,194
8	50 мМ гистидин , 50 мМ метиони н, 100 мМ Arg- HCl, pH 6	0,139 0,139 0,137	0,138	0,175 0,173 0,174	0,174	0,191 0,188 0,189	0,189
9	50 мМ гистидин , 10 мМ	0,141 0,143 0,141	0,142	0,164 0,160 0,164	0,163	0,186 0,184 0,182	0,184

		метионин, 50 мМ Arg-HCl, pH 6					
--	--	-------------------------------	--	--	--	--	--

2) Результаты анализа агрегатов и фрагментов

В результате анализа SEC-ВЭЖХ величина увеличения уровня агрегатов и фрагментов в зависимости от каждого из условий концентрации эксципиентов не продемонстрировала значимых отличий. Однако стабильность в условиях основного буфера (условия 1), представляющего собой 50 мМ гистидин, была высокой, и образование агрегатов было сниженным, когда добавляли 100 мМ гидрохлорид L-аргинина, а не 50 мМ. Кроме того, было подтверждено, что количество агрегатов и фрагментов возрастало в зависимости от концентрации L-метионина, и присутствие или отсутствие добавленного D-маннита имело небольшое отличие или небольшое увеличение относительно условий основного буфера (таблица 31 и фиг.15).

[Таблица 31]

Условия №	Относительная чистота (мономер)			Изменения на неделе 2 (W2-W0)		Изменения на неделе 4 (W4-W0)	
	Неделя 0	Неделя 2	Неделя 4	Δ агрегаты	Δ фрагменты	Δ агрегаты	Δ фрагменты
1	100,0	96,5	94,8	1,7	1,6	2,6	2,4
2	100,0	95,8	94,2	2,3	1,7	2,9	2,6
3	100,0	96,5	94,6	1,7	1,6	2,6	2,6
4	100,0	95,6	94,1	2,6	1,6	3,3	2,3
5	100,0	96,1	94,7	2,0	1,8	2,6	2,5
6	100,0	95,9	94,3	2,2	1,7	2,8	2,6
7	100,0	95,9	94,1	2,2	1,7	3,2	2,5
8	100,0	95,9	94,5	2,2	1,7	2,8	2,5
9	100,0	94,9	93,0	2,6	2,4	3,4	3,3

3) Результаты анализа зарядовых вариантов

В результате анализа СЕХ-ВЭЖХ не наблюдали заметных изменений зарядовых вариантов в зависимости от каждого из условий эксципиентов (фиг.16).

4) Результаты анализа вязкости и осмолярности

В результате измерения вязкости и осмолярности в зависимости от каждого из условий концентрации эксципиентов, было подтверждено, что эффект снижения вязкости был высоким в условиях, когда гидрохлорид L-аргинина добавляли в концентрации 100 мМ, а не 50 мМ, и большинство из них имели от 112 до 588 мосмоль/кг для удовлетворения критериям осмолярности (таблица 32).

[Таблица 32]

Условия №	Вязкость (сПз, 25°C)				Осмолярность (мосмоль/кг)	
	Неделя 0		Неделя 4		Неделя 0	
	Буфер	Образец	Буфер	Образец	Буфер	Образец
1	1,062	18,682	25,033	6,321	80	112
2	1,081	16,426	28,315	11,889	232	297
3	1,120	12,148	15,029	2,881	283	331
4	1,126	19,706	30,707	11,001	305	408
5	1,176	17,528	18,147	0,619	401	500
6	1,185	17,800	29,186	11,386	446	588
7	1,168	25,624	28,682	3,058	349	474
8	1,133	18,321	18,282	-0,039	335	432
9	1,081	13,958	14,756	0,798	192	238

Пример 2.4.2. Второй скрининг концентрации эксципиентов

Среди основного гистидинового буфера, выбранного в первом скрининге концентрации эксципиентов примера 1.4.1 и двух эксципиентов, для выбора оптимальной концентрации гидрохлорида L-аргинина образцы 2 партий HL161BKN (HL161BKN B018 и HL161BKN B021) оценивали в отношении стабильности посредством теста концентрации, мутности, чистоты (агрегаты и фрагменты), вязкости, осмолярности, и пригодности для введения посредством подкожной инъекции (п/к) в четырех условиях. В результате, 100 мМ L-гистидин, 100 мМ гидрохлорид L-аргинина, 0,02% PSB20, pH 6,0, были определены в качестве конечного состава HL161BKN (таблица 33).

[Таблица 33]

Условия	L-гистидин (основной буфер) (мМ)	L-Arg-HCl (мМ)	PSB20 (%)	HL161BKN Партия №
1	50	100	0,02	B018
2	50	150	0,02	
3	100	100	0,02	
4	150	50	0,02	
1	50	100	0,02	B021
2	50	150	0,02	
3	100	100	0,02	
4	150	50	0,02	

1) Анализ концентрации (A280) и мутности (A340)

Происходило небольшое изменение концентрации HL161BKN в течение 4 недель, что, как ожидалось, было эффектом предотвращения испарения буфера путем накрывания 1,5-мл микроцентрифужной пробирки парафильмом, а затем хранения ее в термогидростате (таблица 34). Кроме того, мутность во всех условиях продемонстрировала незначительное повышение на 0,102 или менее (таблица 35).

[Таблица 34]

Условия			0 неделя				2 неделя				4 неделя			
			Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация	Показатель OD280	Среднее значение	Коэффициент разведения	Концентрация
В018 (совокупность)	1	50 мМ гистидин, 100 мМ Arg-HCl, pH 6	35,485	35,547	10	220,8	34,738	34,727	10	215,7	34,493	34,474	10	214,1
			35,354				34,556				34,600			
			36,128				34,887				34,329			
	2	50 мМ гистидин, 150 мМ Arg-HCl, pH 6	36,112	36,128	10	224,4	36,017	36,022	10	223,7	34,073	34,095	10	211,8
			36,154				36,057				34,100			
			36,117				35,992				34,201			
	3	100 мМ гистидин, 100	37,151	37,273	10	231,5	35,054	35,005	10	217,4	33,163	33,265	10	206,6
			37,272				35,016				33,197			
			37,396				34,946				33,434			

		мМ Arg- HCl, pH 6												
	4	150 мМ гистид ин, 50 мМ Arg- HCl, pH 6	35,793 35,722 36,015	35,843	10	222,6	33,970 34,009 34,003	33,994	10	211,1	33,999 34,146 34,003	34,049	10	211,5
B021 (13D 7)	1	50 мМ гистид ин, 100 мМ Arg- HCl, pH 6	34,958 35,292 35,004	35,085	10	217,9	36,516 36,348 36,494	36,453	10	226,4	35,538 35,522 35,838	35,633	10	221,3
	2	50 мМ гистид ин, 150 мМ Arg-	35,187 35,504 35,346	35,346	10	219,5	32,950 32,955 32,753	32,886	10	204,3	35,910 35,990 36,019	35,973	10	223,4

		HCl, pH 6												
	3	100 мМ гистидин, 100 мМ Arg-HCl, pH 6	33,123	33,218	10	206,3	36,664	36,632	10	227,5	34,242	34,278	10	212,9
			33,329				36,712				34,408			
			33,203				36,520				34,184			
	4	150 мМ гистидин, 50 мМ Arg-HCl, pH 6	35,554	35,584	10	221,0	38,367	38,305	10	237,9	36,008	36,052	10	223,9
			35,600				38,500				36,075			
			35,597				38,048				36,072			

[Таблица 35]

Условия			0 неделя		2 неделя		4 неделя		ΔOD3	
			Показате ль OD340	Средне е значен ие	Показате ль OD340	Средне е значен ие	Показате ль OD340	Средне е значен ие	40 (T4- T0)	
B018 (сово -куп- ност ь)	1	50 мМ	0,068	0,066	0,084	0,082	0,094	0,092	0,026	
		гистиди	0,068		0,080		0,092			
		н, 100 мМ Arg- HCl, pH 6	0,063		0,083		0,091			
	2	50 мМ	0,060	0,060	0,084	0,082	0,092	0,091	0,031	
		гистиди	0,063		0,080		0,092			
		н, 150 мМ Arg- HCl, pH 6	0,057		0,083		0,090			
	3	100 мМ	0,065	0,064	0,084	0,082	0,100	0,099	0,034	
		гистиди	0,065		0,082		0,100			
		н, 100 мМ Arg- HCl, pH 6	0,063		0,080		0,096			
	4	150 мМ	0,064	0,061	0,084	0,083	0,107	0,107	0,046	
		гистиди	0,060		0,082		0,109			
		н, 50 мМ Arg- HCl, pH 6	0,060		0,082		0,105			
	B021	1	50 мМ	0,140	0,142	0,214	0,216	0,244	0,244	0,102

(13D 7)		гистидин, 100 мМ Arg-HCl, pH 6	0,143		0,218		0,245		
			0,142		0,216		0,242		
	2	50 мМ гистидин, 150 мМ Arg-HCl, pH 6	0,139	0,140	0,187	0,186	0,202	0,201	0,061
			0,139		0,186		0,200		
			0,142		0,186		0,202		
	3	100 мМ гистидин, 100 мМ Arg-HCl, pH 6	0,135	0,138	0,195	0,193	0,213	0,214	0,076
			0,142		0,193		0,215		
			0,136		0,192		0,213		
	4	150 мМ гистидин, 50 мМ Arg-HCl, pH 6	0,144	0,140	0,203	0,203	0,230	0,230	0,90
			0,137		0,205		0,229		
			0,139		0,201		0,231		

2) Анализ агрегатов и фрагментов

В анализе SEC-ВЭЖХ увеличение количества агрегатов и фрагментов в соответствии с каждым из условий эксперимента не продемонстрировали значимого отличия, однако было подтверждено, что образование агрегатов было наименьшим в условиях 3 (100 мМ L-гистидин, 100 мМ L-аргинин HCl, 0,02% PSB20, pH 6,0) и условиях 4 (50 мМ L-гистидин, 100 мМ L-аргинин HCl, 0,02% PSB20, pH 6,0) (таблица 36 и фиг.17).

[Таблица 36]

Парти	Услови	Относительная чистота	Изменения на неделе	Изменения на неделе
-------	--------	-----------------------	---------------------	---------------------

я №	я №	(мономер)			2 (W2-W0)		4 (W4-W0)	
		Недел я 0	Недел я 2	Недел я 4	Δ агрегаты	Δ фрагмент ы	Δ агрегаты	Δ фрагмент ы
B018	1	100,0	96,6	94,9	1,5	1,9	2,3	2,7
	2	100,0	96,3	95,2	1,7	2,0	2,2	2,6
	3	100,0	96,7	95,3	1,3	2,0	1,8	2,8
	4	100,0	96,7	95,5	1,1	2,1	1,6	2,9
B021	1	100,0	96,1	94,1	1,5	2,3	2,1	3,7
	2	100,0	96,0	94,3	1,7	2,2	2,2	3,4
	3	100,0	96,4	94,6	1,3	2,2	1,6	3,7
	4	100,0	96,3	94,7	1,3	2,4	1,6	3,7

3) Анализ зарядовых вариантов

В результате анализа СЕХ-ВЭЖХ не наблюдали явных отличий зарядовых вариантов (основные и кислотные варианты) в зависимости от каждого условия эксципиентов (фиг.18).

4) Анализ вязкости и осмолярности

В результате измерения вязкости и осмолярности в зависимости от каждого из условий концентрации эксципиентов, вязкость регулировалась на уровне от 11 до 16 сПз, т.е. ниже предела 20 сПз, что является пределом вязкости продуктов для подкожного введения, и осмолярность составляла от 350 до 465 мосмоль/кг, удовлетворяя критериям от 250 до 500 мосмоль/кг (таблица 37).

[Таблица 37]

Парти я №	Условия №	Вязкость (сПз, 25°C)			Осмолярность (мосмоль/кг)			
		Неделя 0		Неделя 4	Неделя 0		Неделя 4	
		Буфер	Образец	Образец	Буфер	Образец	Образец	ΔмОс м (W4- W0)
B018	1	1,146	10,956	14,067	271	350	360	10
	2	1,160	13,126	12,117	360	429	436	7
	3	1,162	13,548	12,024	367	443	446	3
	4	1,153	11,848	11,777	373	465	475	10
B021	1	1,146	13,466	13,834	271	355	434	79
	2	1,160	14,030	11,871	360	453	458	5
	3	1,162	13,132	11,881	367	448	453	5

	4	1,153	15,875	13,351	373	465	471	6
--	---	-------	--------	--------	-----	-----	-----	---

5) Анализ нерастворимых невидимых невооруженным глазом частиц

Анализ нерастворимых невидимых невооруженным глазом частиц для образцов HL161BKN каждых из условий эксципиентов с использованием микропоточковой визуализации (MFI) проводили в New Drug Development Support Center, Osong Hi-tech Medical Industry Promotion Foundation.

Образцы каждых из условий разбавляли до 10 мг/мл для сравнения увеличения количества не видимых невооруженным глазом частиц в диапазоне от 5 мкм до 100 мкм. В результате, увеличение количества невидимых невооруженным глазом частиц было наименьшим в случае условий 3 (таблица 38 и фиг.19).

[Таблица 38]

Условия №	Δколичество невидимых невооруженным глазом частиц					Общее количество невидимых невооруженных глазом частиц (5~100 мкм)		
	$5 \leq x < 10$ мкм	$10 \leq x < 25$ мкм	$25 \leq x < 50$ мкм	$50 \leq x < 75$ мкм	$75 \leq x < 100$ мкм	Неделя 1	Неделя 4	ΔЧастиц ы (W4-W1)
1	30768	8779	402	26	5	2296	42131	39835
2	14463	3059	240	15	4	949	18920	17971
3	5680	1787	163	16	3	966	8516	7550
4	5940	1658	134	7	1	703	8586	7883

Пример 3. Испытание стабильности

Испытание стабильности при длительном хранении в течение 36 месяцев и ускоренное испытание стабильности в конечных выбранных условиях состава для HL161BKN проводились Catalent (США). Для оценки стабильности лекарственный продукт (DP) хранили с использованием флакона из борсиликатного стекла и покрытой тефлоном резиновой пробки. В результате подтверждения стабильности в выбранных условиях состава была подтверждена стабильность DP в течение 36 месяцев, тем самым подтверждая возможность разработки в качестве инъекционного средства (таблица 39 и таблица 40).

[Таблица 39]

Лекарственный продукт, стабильность при длительном хранении при 5±3°C										
Тестируемое изделие	Описание	Тестируемые моменты времени (Месяцы)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Внешний вид	Прозрачная жидкость	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная
	от бесцветной до немного желтой в прозрачном бесцветном стеклянном флаконе; по существу свободна от частиц	немного желтая жидкость в прозрачно м бесцветно м	немного желтая жидкость в прозрачн ом бесцветн ом	немного желтая жидкость в прозрачн ом бесцветн ом	немного желтая жидкость в прозрачн ом бесцветн ом	немного желтая жидкость в прозрачн ом бесцветн ом	немного желтая жидкость в прозрачн ом бесцветн ом	немного желтая жидкость в прозрачн ом бесцветн ом	немного желтая жидкость в прозрачно м бесцветно м	немного желтая жидкость в прозрачн ом бесцветн ом
pH	5,5-6,5	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
A280	153-187	176 мг/мл	169 мг/мл	174 мг/мл	175 мг/мл	177 мг/мл	174 мг/мл	174 мг/мл	179 мг/мл	176 мг/мл

	мг/мл									
CE-SDS, восста- новленный	Суммарное значение для тяжелой цепи и легкой цепи ≥95%	98,6%	98,4%	98,4%	98,5%	98,1%	97,9%	97,8%	98,0%	97,7%
CE-SDS, невосста- новленный ¹⁾	Результат интактного антитела (XX, X%)	89,9%	96,0%	95,8%	96,0%	95,4%	96,0%	95,8%	94,5%	95,1%
SEC-ВЭЖХ	Основной пик ≥90% Агрегаты и фрагменты ≤10%	99,4% <LLOQ	99,6% <LLOQ	98,4% 1,6%	98,8% 1,2%	99,4% <LLOQ	98,8% 1,2%	96,4% 3,6%	98,5% 1,5%	98,5% 1,5%
cIEF	Результат величины pI основного пика Результат	pI=7,75 B: 1,25% M: 75,61% A: 23,14%	pI=7,78 B: 2,01% M: 77,17% A: 20,81%	pI=7,82 B: 2,01% M: 76,78% A: 21,21%	pI=7,80 B: 2,27% M: 75,29% A: 22,44%	pI=7,87 B: 2,12% M: 75,18% A: 22,70%	pI=7,74 B: 0,91% M: 78,55% A: 20,55%	pI=7,85 B: 2,66% M: 72,64% A: 24,70%	pI=7,82 B: 2,67% M: 72,06% A: 25,27%	pI=7,79 B: 2,21% M: 67,72% A: 30,06%

	% площади основной группы Результат % площади главной группы Результат % площади кислотной группы									
Эффективно сть	70~130% относитель но стандарта для сравнения	82%	108%	92%	107%	118%	118%	110%	96%	106%
Материал в форме частиц	≥10 мкм; ≤6000 частиц/ контейнер ≥25 мкм; ≤600	≥10 мкм: 105 ≥25 мкм: 0	Тести- рование не проводил ось	≥10 мкм: 4356 ≥25 мкм: 73	≥10 мкм: 14 ≥25 мкм: 0	≥10 мкм: 17 ≥25 мкм: 2	≥10 мкм: 42 ≥25 мкм: 1	≥10 мкм: 55 ≥25 мкм: 1	≥10 мкм: 143 ≥25 мкм: 5	≥10 мкм: 373 ≥25 мкм: 10

	частиц/ контейнер									
Объем в контейнере	Не менее заявленног о объема	1 мл	Тести- рование не проводил ось	Тести- рование не проводил ось	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл
Эндотоксин	≤0,5 МЕ/мг белка	<0,1 МЕ/мг	Тести- рование не проводил ось	Тести- рование не проводил ось	Тести- рование не проводил ось	Тести- рование не проводил ось	<0,1 МЕ/мг	Тести- рование не проводил ось	<0,1 МЕ/мг	<0,1 МЕ/мг
Стерильност ь	Рост отсутствует	Рост отсутству ет	Тести- рование не проводил ось	Тести- рование не проводил ось	Тести- рование не проводил ось	Тести- рование не проводил ось	Рост отсутству ет	Тести- рование не проводил ось	Рост отсутствуе т	Рост отсутству ет

[Таблица 40]

Лекарственный продукт, стабильность при хранении в условиях ускоренного испытания при 25±2°C/60±5%RH					
Тестируемое изделие	Описание	Тестируемые моменты времени (Месяцы)			
		0	1	3	6
Внешний вид	Прозрачная жидкость от бесцветной до	Прозрачная немного желтая жидкость в	Прозрачная светло- желтая жидкость в	Прозрачная немного желтая	Прозрачная немного желтая жидкость в

	немного желтой в прозрачном бесцветном стеклянном флаконе; по существу свободна от частиц	прозрачном бесцветном стеклянном флаконе; по существу свободна от частиц	прозрачном бесцветном стеклянном флаконе; по существу свободна от частиц	жидкость в прозрачном бесцветном стеклянном флаконе; по существу свободна от частиц	прозрачном бесцветном стеклянном флаконе; по существу свободна от частиц
pH	5,5-6,5	5,9	5,9	5,9	5,9
A280	153-187 мг/мл	176 мг/мл	169 мг/мл	171 мг/мл	177 мг/мл
CE-SDS, восста- новленный	Суммарное значение для тяжелой цепи и легкой цепи $\geq 95\%$	98,6%	98,3%	97,9%	97,3%
CE-SDS, невосста- новленный ¹⁾	Результат интактного антитела (XX, X%)	89,9%	95,7%	95,0%	93,7%
SEC-ВЭЖХ	Основной пик $\geq 90\%$ Агрегаты и фрагменты $\leq 10\%$	99,4% <LLOQ ²⁾	99,1% 0,9%	97,5% 2,6%	94,8% 5,2%
cIEF	Результат величины pI основного пика Результат % площади основной группы Результат % площади	pI=7,75 B: 1,25% M: 75,61% A: 23,14%	pI=7,81 B: 2,54% M: 73,72% A: 23,74%	pI=7,82 B: 3,28% M: 67,30% A: 29,42%	pI=7,77 B: 3,98% M: 60,60% A: 35,42%

	главной группы Результат % площади кислотной группы				
Эффективность	70~130% относительно стандарта для сравнения	82%	104%	79%	72%
Материал в форме частиц	≥10 мкм; ≤6000 частиц/ контейнер ≥25 мкм; ≤600 частиц/ контейнер	≥10 мкм: 105 ≥25 мкм: 0	Тестирование не проводилось	≥10 мкм: 4478 ≥25 мкм: 14	≥10 мкм: 12 ≥25 мкм: 0

Пример 4. Выбор конечного состава антитела, являющегося кандидатом для разработки

Поскольку HL161BKN демонстрирует тенденцию к тому, чтобы быть в высокой степени стабильным в высокой концентрации в составе, было задумано подтвердить вероятность разработки в инъекционной форме для подкожного введения. При разработке инъекционной формы известно, что для подкожного введения является пригодной вязкость 20 сПз или менее для уменьшения боли и побочных эффектов в области введения. Таким образом, HL161BKN концентрировали в условиях 9-ступенчатого концентрирования, и вязкость определяли в условиях 5°C и 25°C. В результате подтверждения вязкости образца HL161BKN, имевшего высокую концентрацию 170 мг/мл, было подтверждено, что он имел вязкость 10 сПз при 25°C, и, таким образом, было возможным подкожное введение (фиг.20).

Было подтверждено, что HL161BKN имело в высокой степени стабильные свойства даже в высокой концентрации 200 мг/мл или более в вышеупомянутом испытании состава. В результате, ожидается, что в будущем будет возможной разработка п/к инъекционного продукта для самостоятельного введения. Учитывая, что все продукты других конкурирующих компаний представляют собой продукты инфузионного типа, является возможной дифференциация для повышения удобства пациентов.

Кроме того, поскольку было подтверждено, что HL161BKN в высокой концентрации было стабильным в составе, также ожидалось, что низкая концентрация HL161BKN будет стабильной в составе. Таким образом, состав может использоваться для HL161BKN в разных концентрациях.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический состав, имеющий pH от 4,0 до 8,0, содержащий
 - (a) антитело против FcRn или его фрагмент,
 - (b) по меньшей мере одну добавку, выбранную из маннита, сорбита, аргинина, гистидина, глицина и их солей,
 - (c) буферную систему, выбранную из цитрата или гистидина, и
 - (d) поверхностно-активное вещество.
2. Фармацевтический состав по п.1, где добавкой является аргинин или его соль и буферной системой является гистидин.
3. Фармацевтический состав по п.1, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.
4. Фармацевтический состав по п.1, дополнительно содержащий метионин.
5. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав имеет инъекционную форму.
6. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав имеет вязкость 20 сПз или менее.
7. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав имеет осмолярность от 250 мосм/кг до 500 мосм/кг.
8. Фармацевтический состав по п.1, где концентрация антитела против FcRn или его фрагмента составляет от 50 мг/мл до 250 мг/мл.
9. Фармацевтический состав по п.8, где концентрация антитела против FcRn или его фрагмента составляет от 80 мг/мл до 250 мг/мл.
10. Фармацевтический состав по п.1, где pH фармацевтического состава составляет от 4,0 до 7,0.
11. Фармацевтический состав по п.1, где антитело против FcRn содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую H-CDR1, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 5, H-CDR2, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 6, и H-CDR3, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 7; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую L-CDR1, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 8, L-CDR2, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 9, и L-CDR3, имеющую аминокислоты SEQ ID NO: 10.
12. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав вводят подкожно.
13. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав содержит
 - (a) от 50 мг/мл до 250 мг/мл антитела против FcRn,
 - (b) 50-250 mM L-аргинин или его соль хлористоводородной кислоты,
 - (c) 50 -250 mM L-гистидиновый буфер и
 - (d) от 0,01 до 0,05% полисорбат 20, и
 фармацевтический состав имеет pH от 4,0 до 7,0.
14. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав имеет увеличенную стабильность, где количество агрегатов и фрагментов HL161BKN составляет

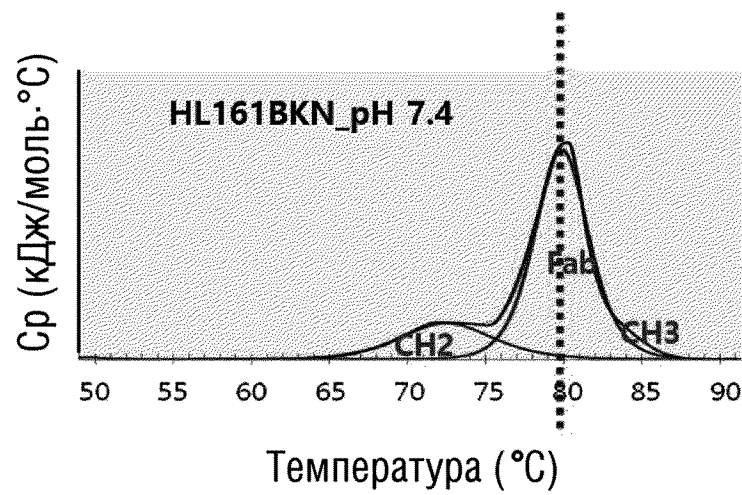
10% или менее при хранении в течение 6 месяцев в условиях ускоренного испытания стабильности (25°C, относительная влажность 60%).

15. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав имеет увеличенную стабильность, где количество агрегатов и фрагментов HL161BKN составляет 10% или менее при хранении в течение 36 месяцев в условиях длительного хранения (5°C).

16. Фармацевтический состав по п.1, где фармацевтический состав имеет увеличенную стабильность, где количество агрегатов и фрагментов HL161BKN составляет 5,0% или менее при хранении в течение 36 месяцев в условиях длительного хранения (5°C).

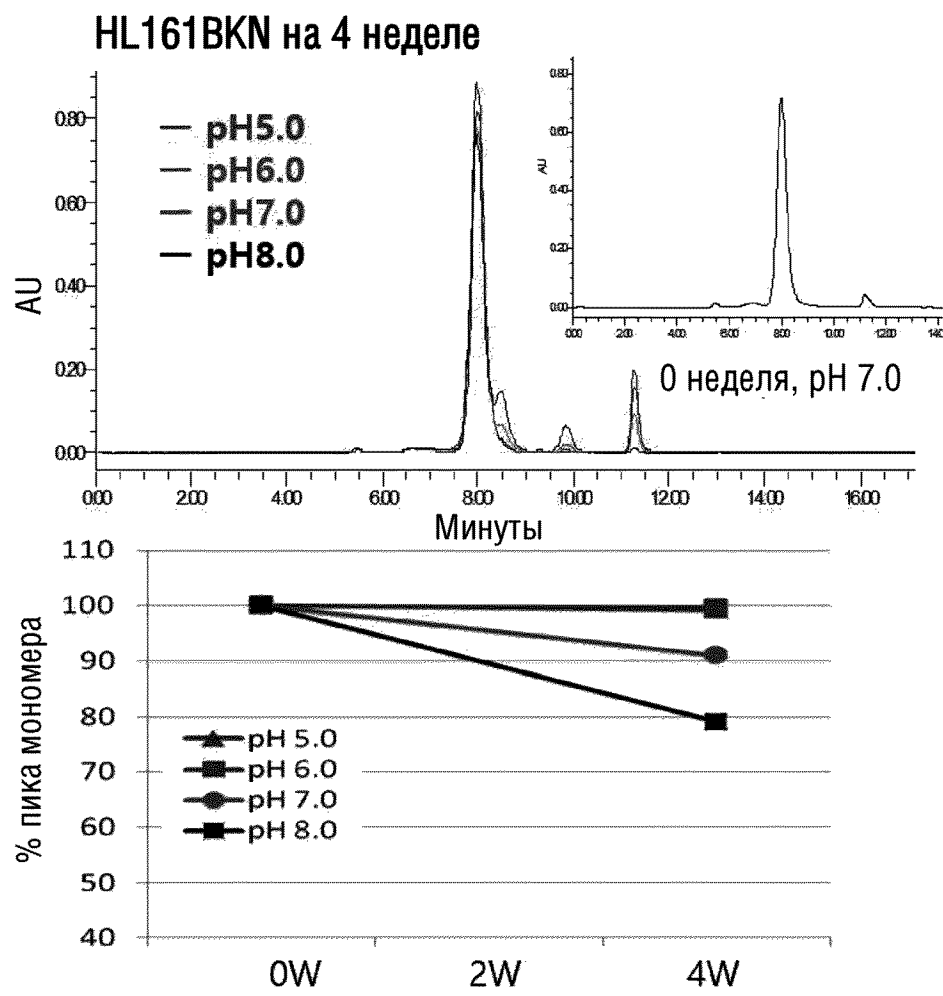
17. Фармацевтический состав по любому из пп.1-16, где фармацевтический состав предназначен для лечения аутоиммунного заболевания, выбранного группы, состоящей из миастении, аутоиммунной офтальмопатии, аутоиммунной гемолитической анемии с тепловыми антителами, оптического нейромиеелита, иммунной тромбоцитопенической пурпуры, пемфигуса обыкновенного, хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии, волчаночного нефрита и мембранозной нефропатии.

ФИГ.1

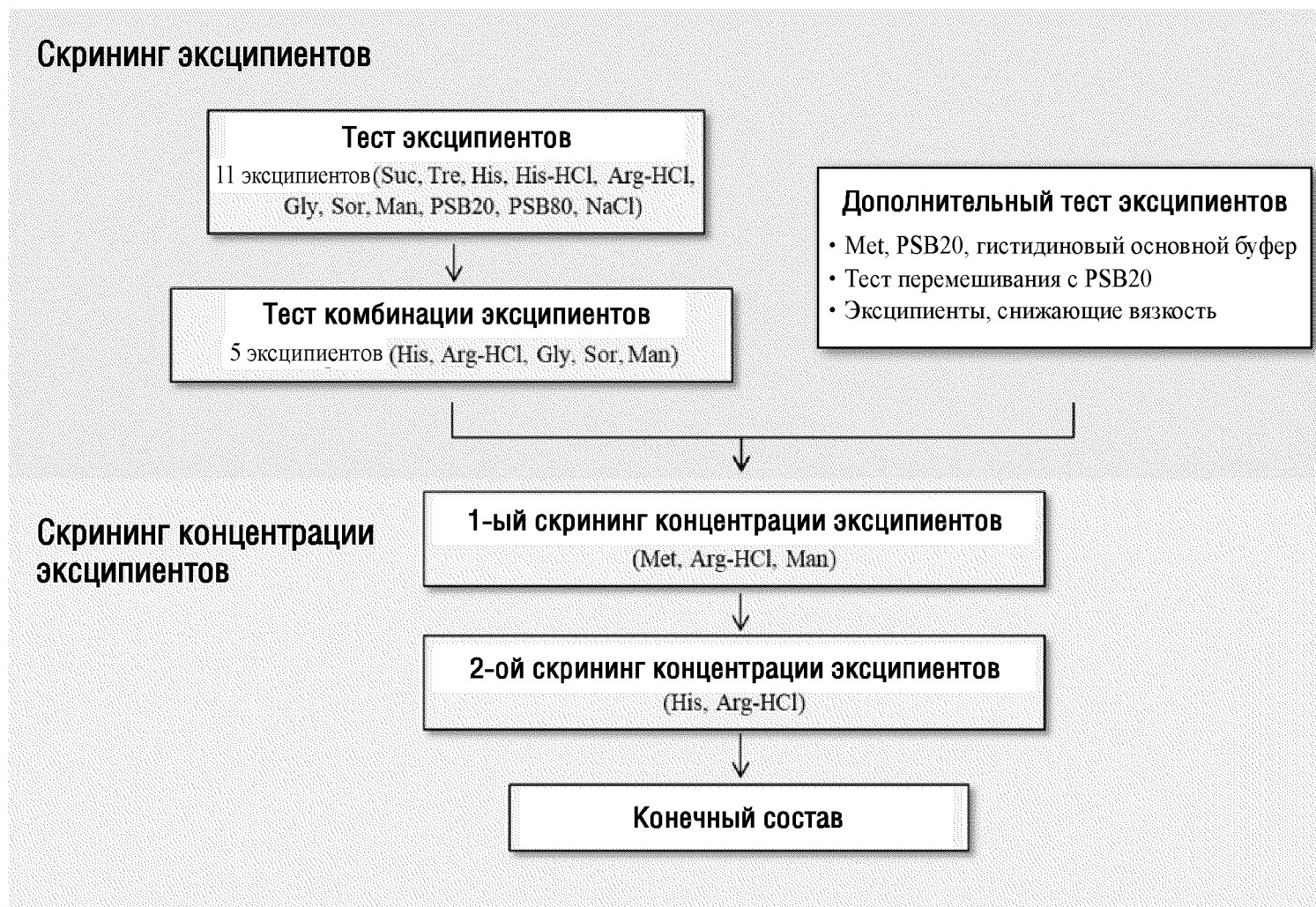


Молекула	Tm (°C)
HL161BKN	79.9

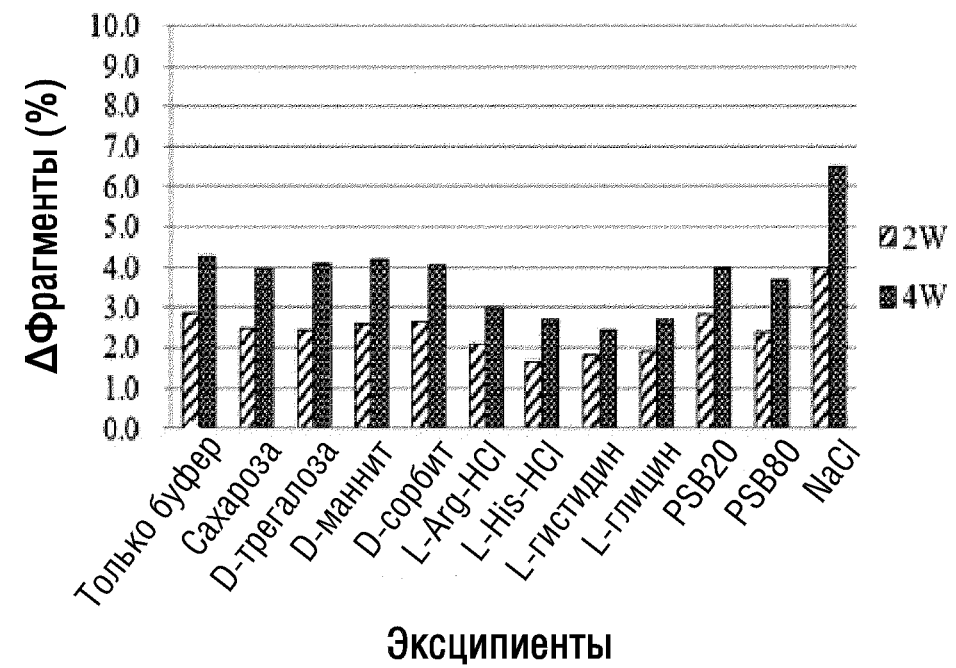
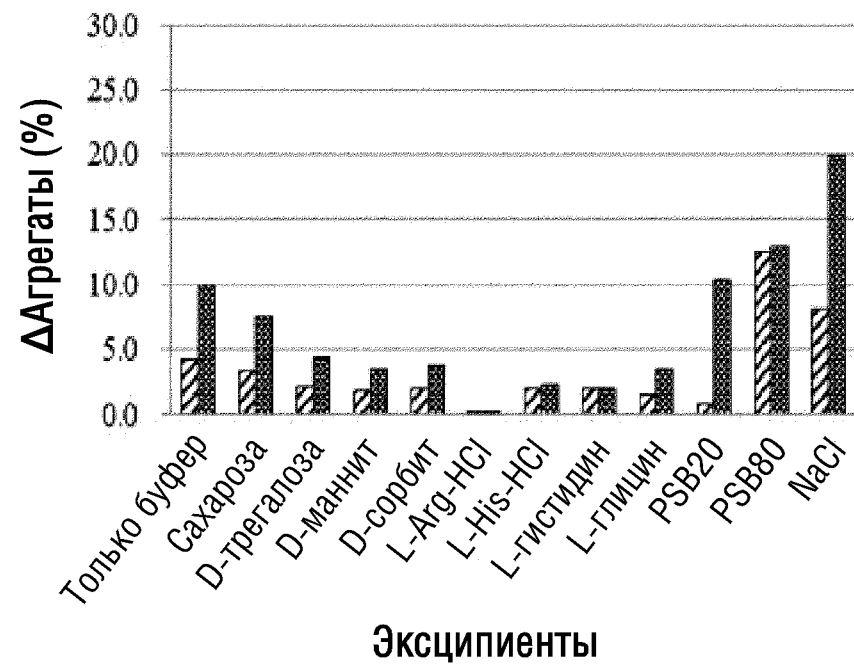
ФИГ.2



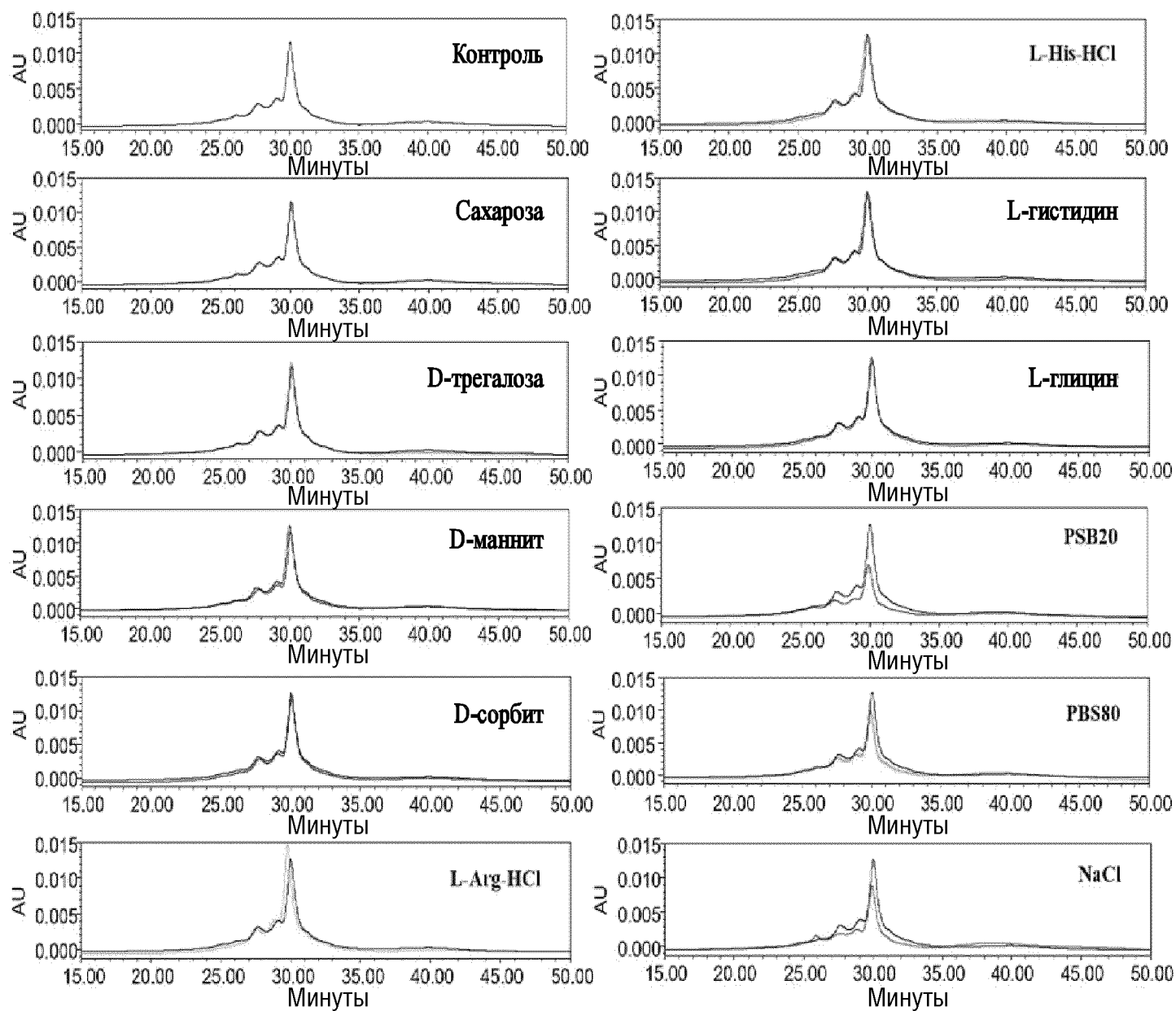
ФИГ.3



ФИГ.4

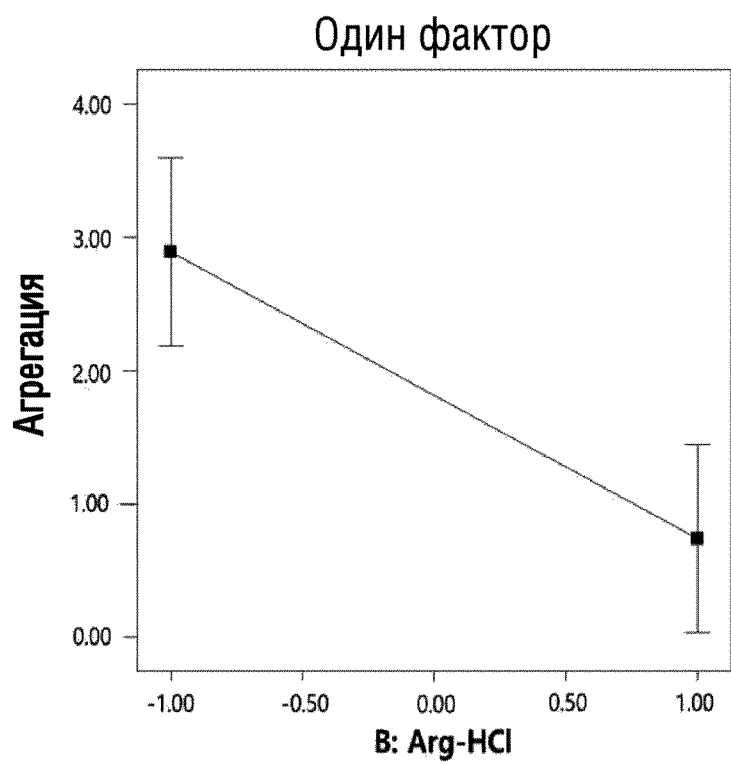
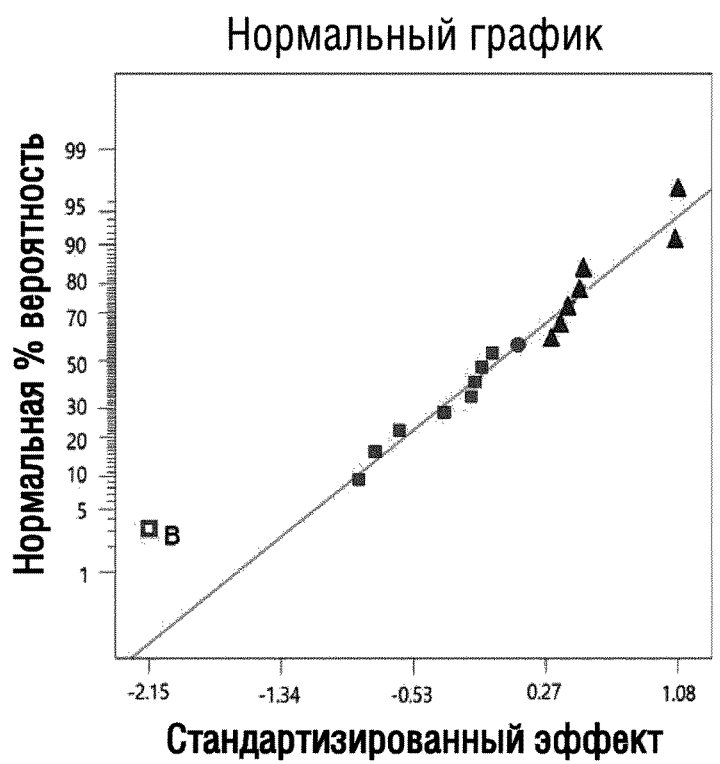


ФИГ.5



ФИГ.6

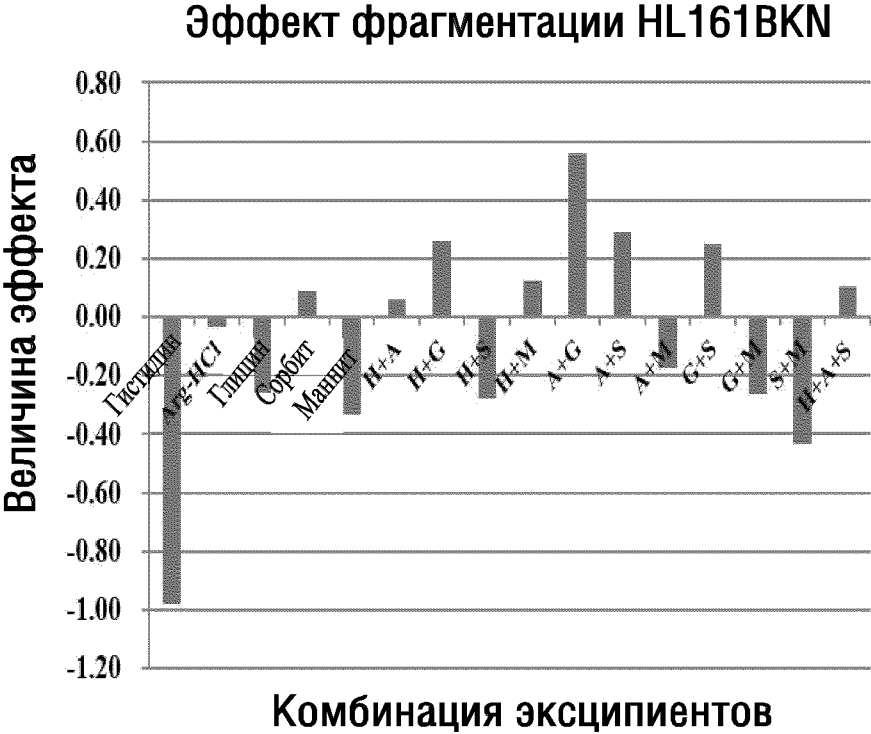
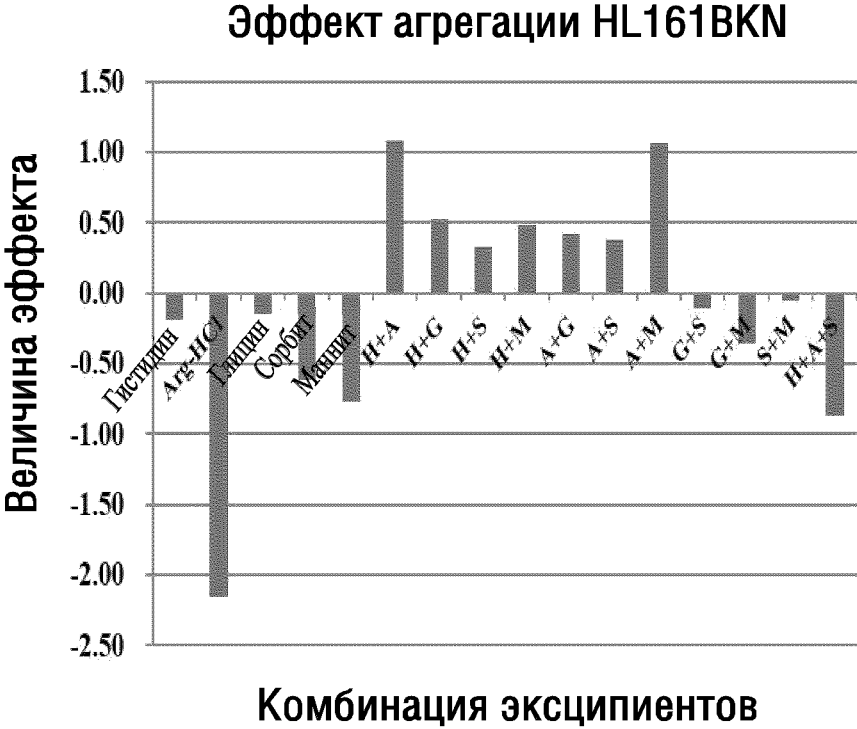
→ Программное обеспечение Design-Expert
Критерий Шапиро-Уилка
Значение W = 0.954
Значение p = 0.596
A: Гистидин
B: Arg-HCl
C: Сорбит
D: Маннит
E: Глицин
■ Положительные эффекты
■ Отрицательные эффекты



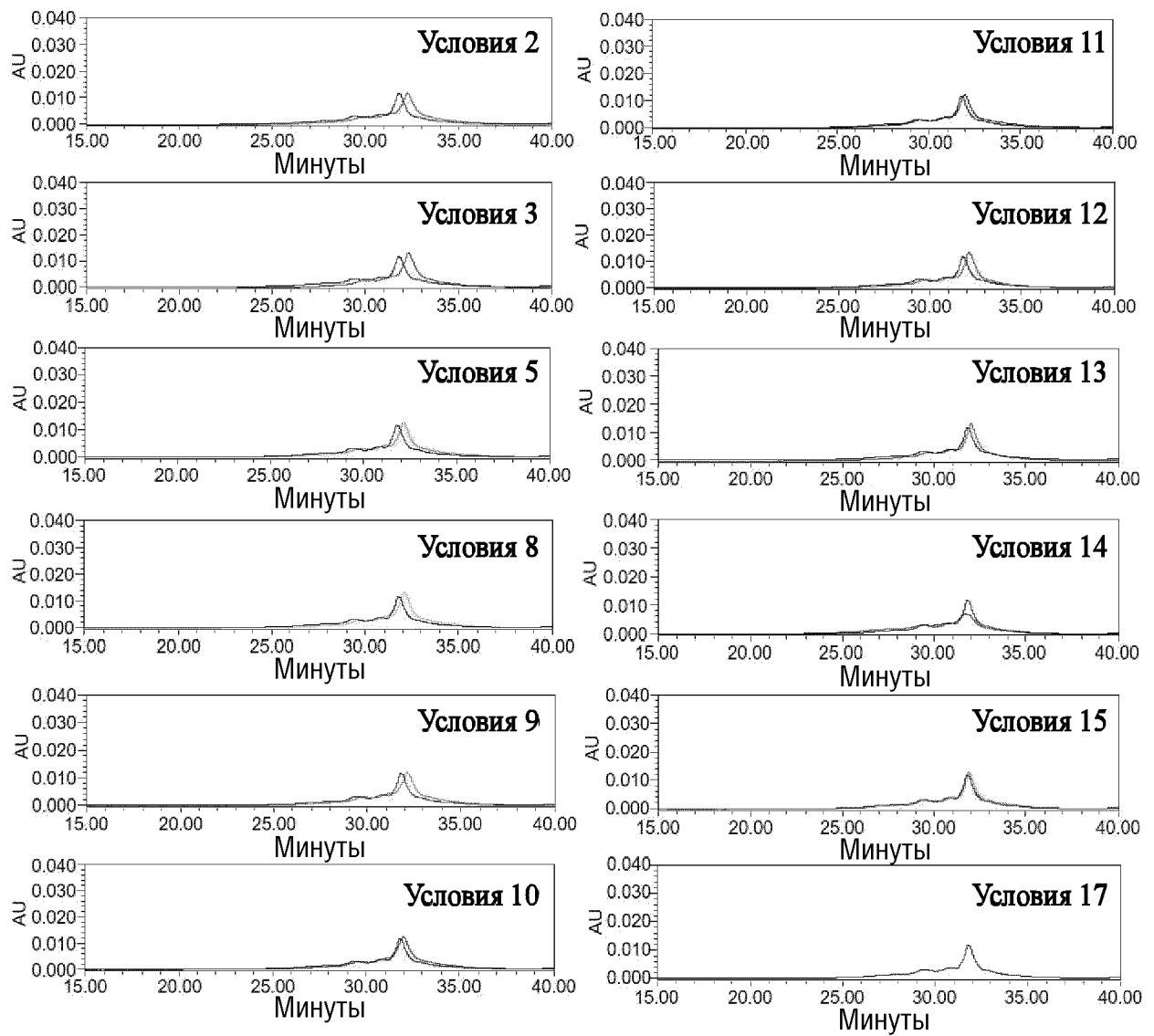
ФИГ.7



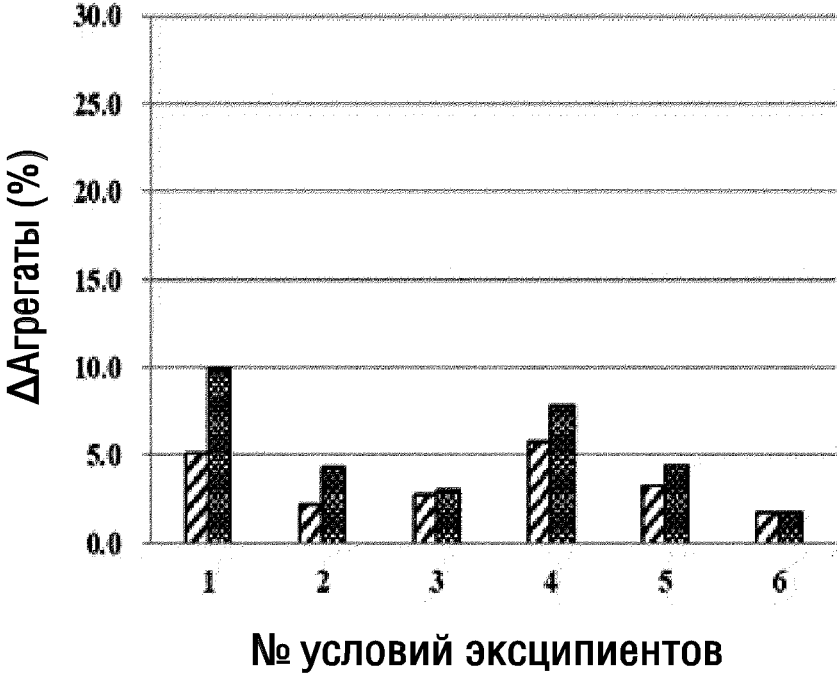
ФИГ.8



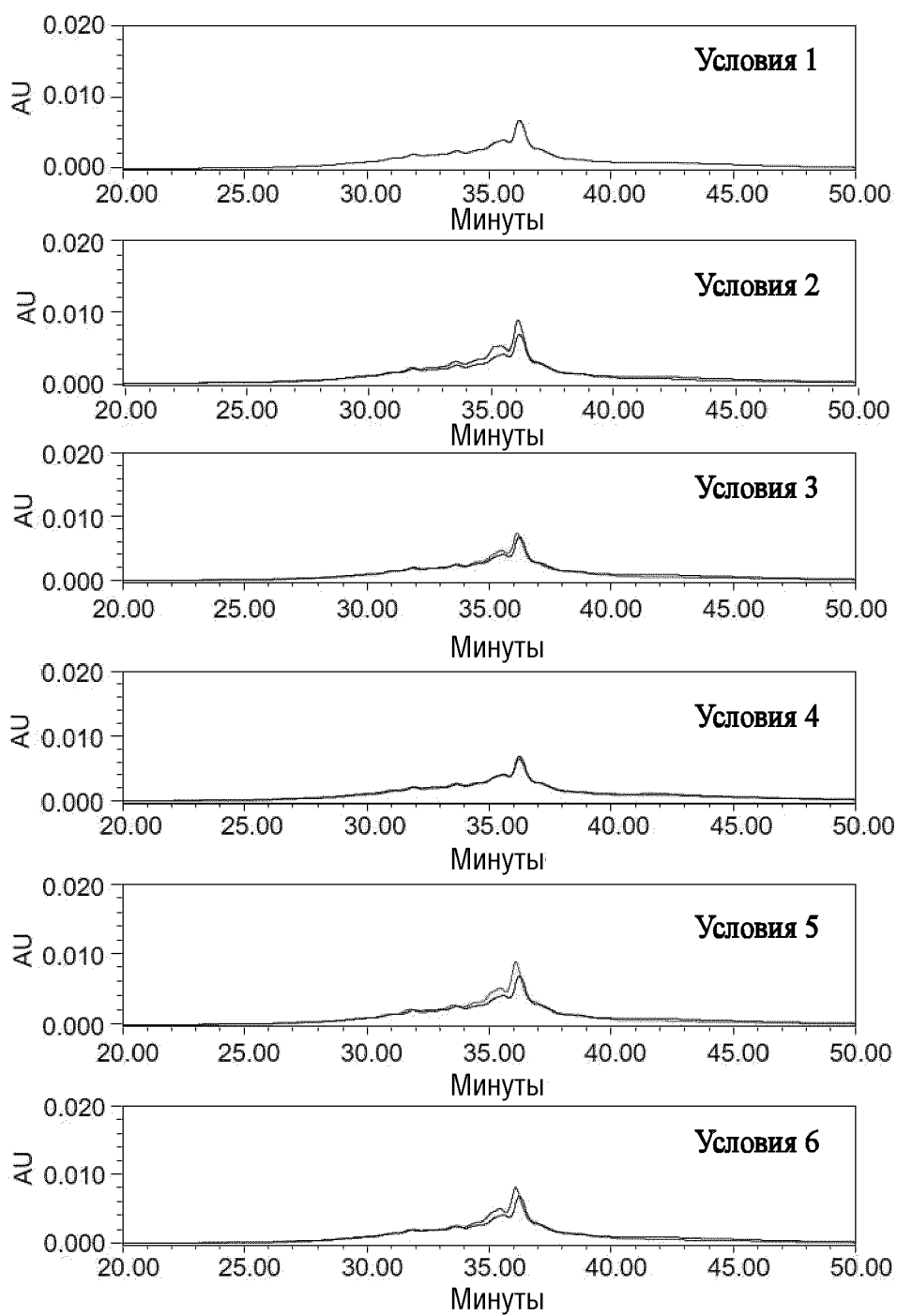
ФИГ.9



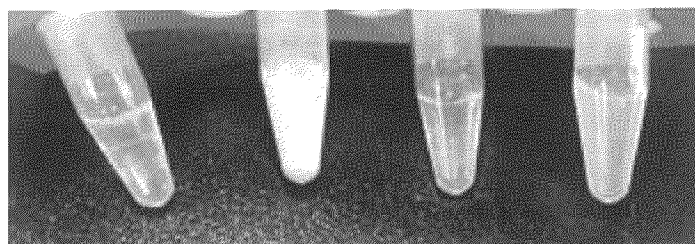
ФИГ.10



ФИГ.11

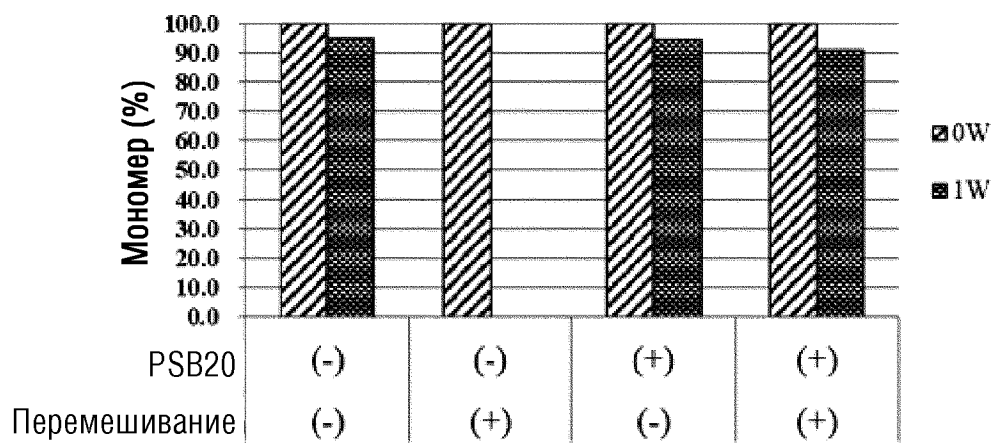


ФИГ.12

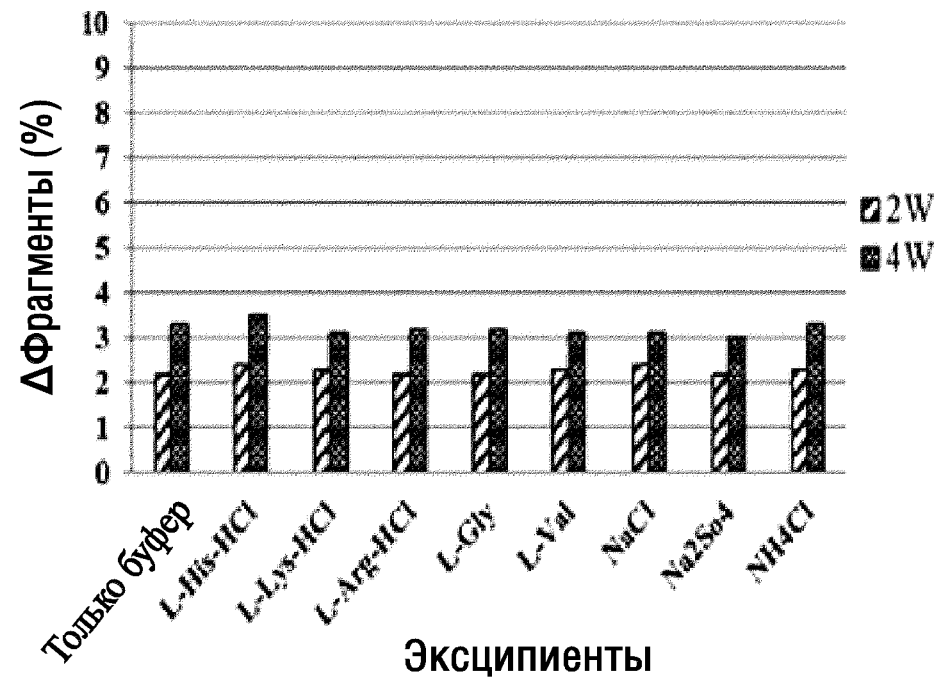


PSB20	(-)	(-)	(+)	(+)
Перемешивание	(-)	(+)	(-)	(+)

ФИГ.13



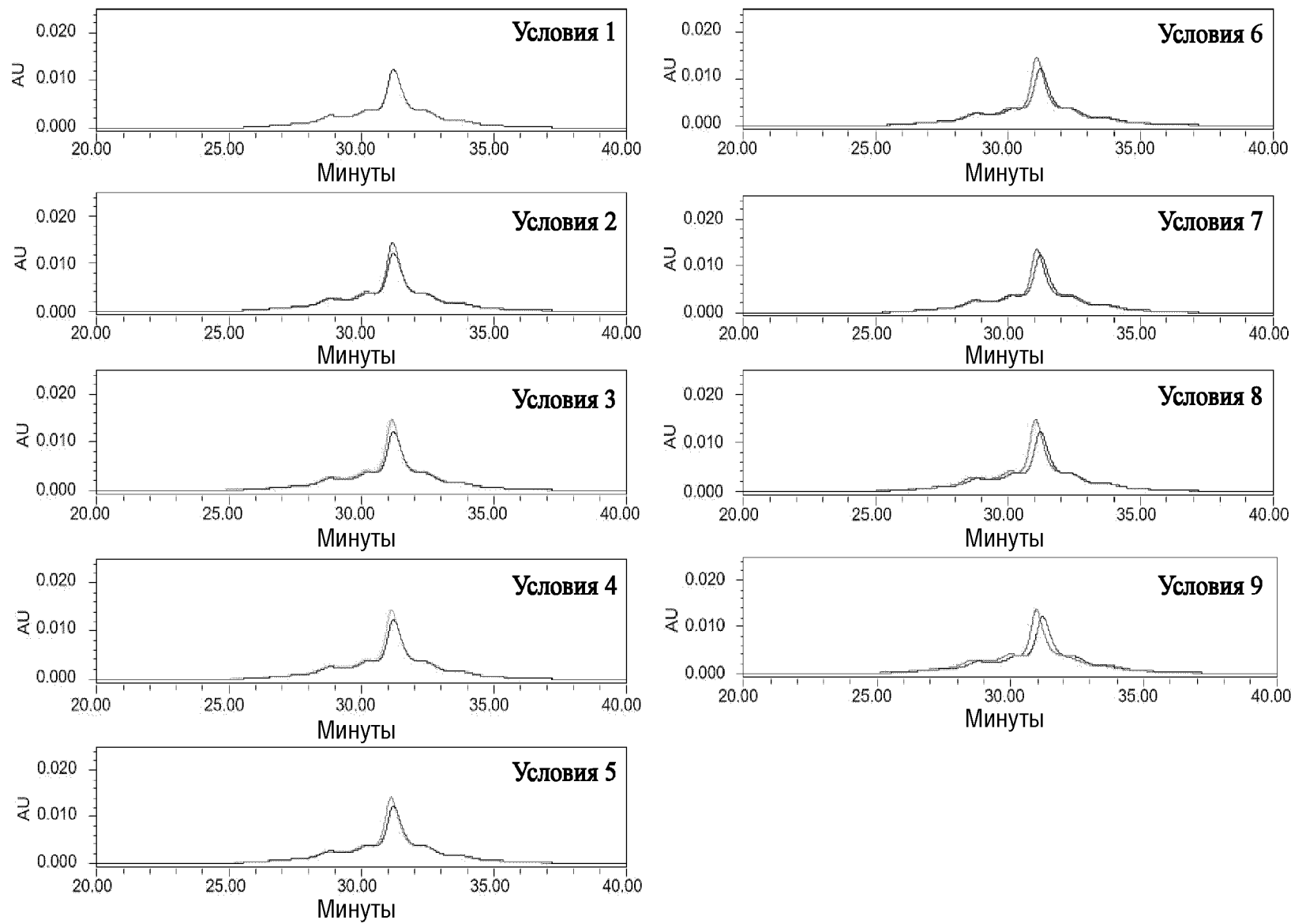
ФИГ.14



ФИГ.15

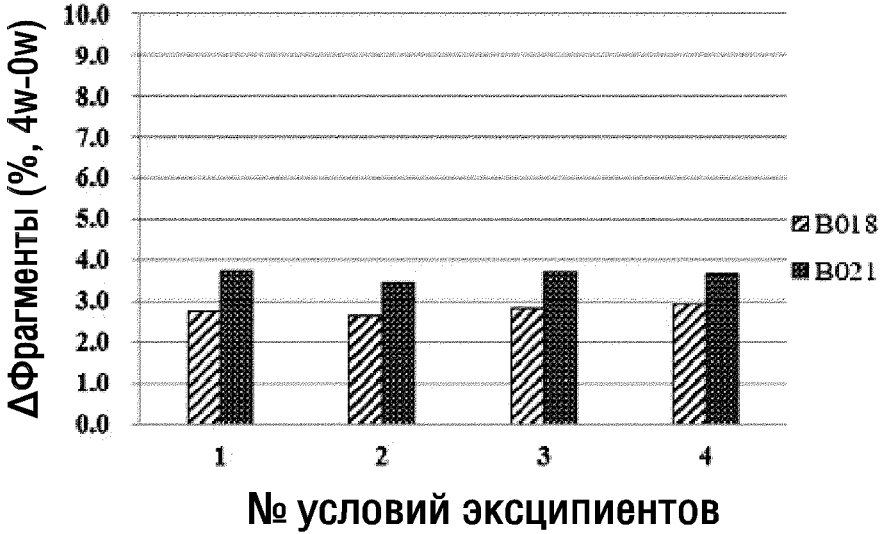


ФИГ.16

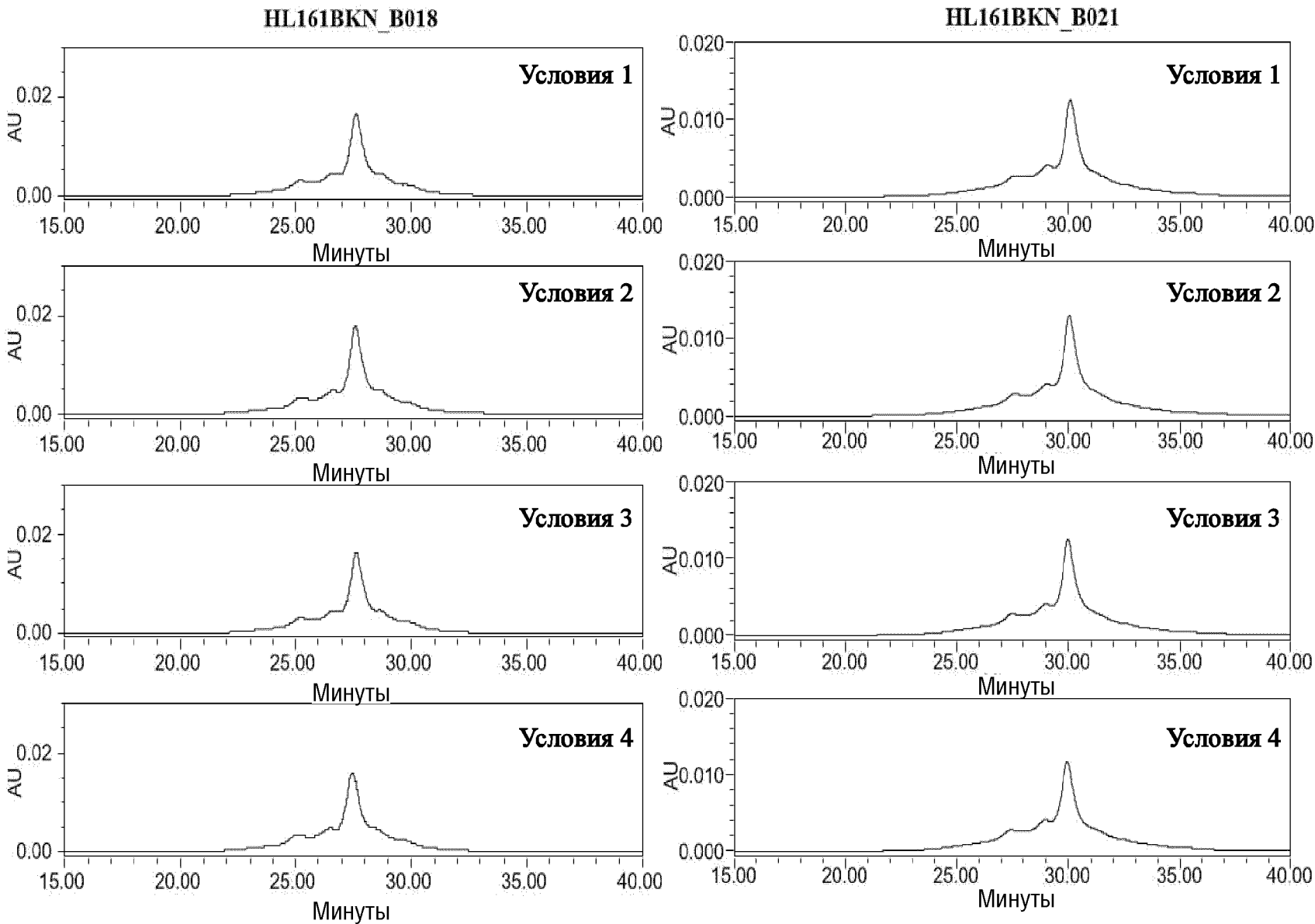


ФИГ.17

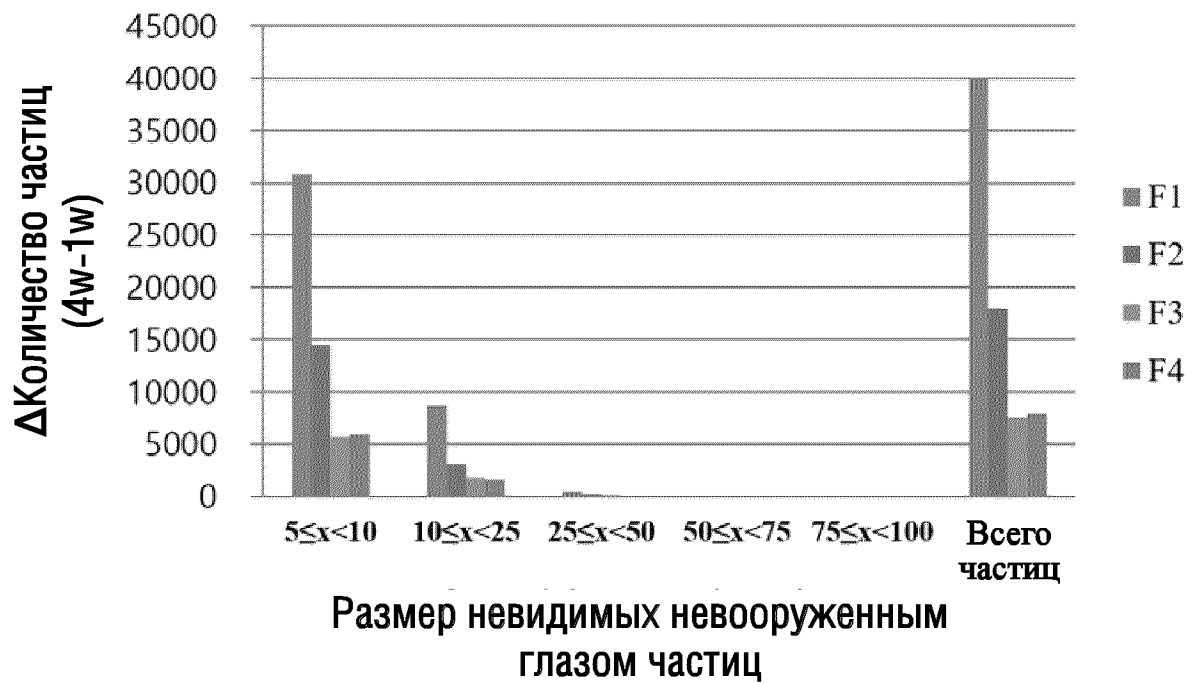
№.	Экспципенты			Вязкость* (сПз)	Осмолярность* (мОсмоль/кг)
	Гистидин (мМ)	Arg-HCl (мМ)	PSB20 (%)		
1	50	100	0.02	12.4±2.0	352.5±3.5
2	50	150	0.02	13.6±0.6	441.0±17.0
3	100	100	0.02	13.3±0.3	445.5±3.5
4	150	50	0.02	13.9±2.8	465.0±0.0



ФИГ.18



ФИГ.19



ФИГ.20

