

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390659 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.21(22) Дата подачи заявки
2021.08.26(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

(54) СТАБИЛЬНЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО К EGFR/c-Met

(31) 63/070,440

(32) 2020.08.26

(33) US

(86) PCT/IB2021/057802

(87) WO 2022/043900 2022.03.03

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Купец Джессика, Шрайер Мелисса,
Шталь Патрик, Торне Сатьен (US)

(74) Представитель:

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

(57) В изобретении представлены стабильные водные фармацевтические композиции, содержащие составы биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)/рецептору фактора роста гепатоцитов (c-Met), и способы их получения. Также в настоящем документе представлены способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, посредством введения субъекту стабильных водных фармацевтических композиций, как описано в настоящем документе. Дополнительно в настоящем документе представлены наборы и изделия, содержащие стабильные водные фармацевтические композиции, как описано в настоящем документе.

A1

202390659

202390659

A1

СТАБИЛЬНЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО К EGFR/C-MET

5

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0001] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который подается в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла JBI6337WOPCT1SEQLIST.txt, с датой создания 26 июля 2021 г. и размером 19 КБ. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

15 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Описаны композиции и способы составления стабильной фармацевтической композиции, содержащей биспецифические антитела к EGFR/c-Met.

20 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Роль как рецептора эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1 или HER1), так и рецептора фактора роста гепатоцитов (c-Met) в развитии рака хорошо известна, что делает эти мишени привлекательными для комбинированной терапии. Оба рецептора передают сигнал через одни и те же пути выживания и антиапоптотические пути (ERK и АКТ). Виды комбинированной терапии, нацеленной на EGFR и c-Met или молекулы биспецифических антител к EGFR/c-Met, были протестированы в различных клинических испытаниях. Несмотря на то что биспецифические антитела к EGFR/c-Met продемонстрировали многообещающие результаты, в данной области знаний сохраняется потребность в содержащих такие антитела фармацевтических композициях, которые стабильны в течение длительных периодов времени при температурах охлаждения (2–8 °C) и окружающей среды.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В настоящем документе описаны стабильные водные фармацевтические композиции, содержащие конкретные составы биспецифического антитела.

[0005] В одном аспекте в настоящем документе представлены стабильные водные фармацевтические композиции, содержащие:

а) от около 44 мг/мл до около 56 мг/мл биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met), причем биспецифическое антитело содержит:

первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область 1 HC1 (VH1);

первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область 1 легкой цепи (VL1);

вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область 2 HC2 (VH2); и

вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область 2 легкой цепи (VL2),

при этом VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными

последовательностями с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9

соответственно; и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 10, 11 и 12

соответственно;

б) от около 8 mM до около 12 mM гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина,

с) от около 6,8% (масс./об.) до около 10,2% масс./об. сахарозы,

д) от около 0,036% (масс./об.) до около 0,084% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80),

е) от около 0,8 мг/мл до около 1,2 мг/мл метионина,

ф) от около 16 мкг/мл до около 24 мкг/мл этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); и

g) pH от около 5,2 до около 6,2.

[0006] В настоящем документе также представлены способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают в себя введение субъекту стабильных водных фармацевтических композиций, как описано в настоящем документе.

[0007] Также в настоящем документе представлены способы получения стабильных водных фармацевтических композиций биспецифического антитела, нацеленного на EGFR и cMet, содержащего первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область 1 HC1 (VH1); первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область 1 легкой цепи (VL1); вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область 2 HC2 (VH2); и вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область 2 легкой цепи (VL2), причем VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно. Способы также включают в себя объединение композиции, содержащей около 50 мг/мл биспецифического антитела, около 10 mM гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина, около 8,5% сахарозы и около 1 мг/мл L-метионина с полисорбатом 80 до конечной концентрации около 0,06% (масс./об.) и EDTA до конечной концентрации около 20 мкг/мл, причем стабильная водная фармацевтическая композиция имеет pH около 5,7.

[0008] Кроме того, в настоящем документе представлены наборы, содержащие стабильные фармацевтические водные составы, как описано в настоящем документе, и инструкции по их применению.

[0009] Далее в настоящем документе представлены изделия, содержащие контейнер со стабильными водными фармацевтическими составами, как описано в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Описанные композиции и способы будут более понятны со ссылкой на приведенное ниже подробное описание в сочетании с прилагаемыми фигурами, которые являются частью настоящего описания. Следует понимать, что описанные композиции и способы не ограничены конкретными композициями и способами, описанными и/или показанными в настоящем документе, и что терминология, используемая в настоящем документе, имеет своей целью описание определенных вариантов осуществления исключительно в качестве примера и не подразумевает ограничения в отношении заявленных композиций и способов.

[0011] Если конкретно не указано иное, любое описание, относящееся к возможному механизму, или способу действия, или причине улучшения, понимают лишь как иллюстративное, и не предусмотрено ограничение описанных композиций и способов корректностью или некорректностью любого такого предполагаемого механизма, или способа действия, или причины улучшения.

[0012] Когда в настоящем документе оговорен или задан диапазон числовых значений, диапазон включает в себя свои конечные точки и все попадающие в него отдельные целые и дробные значения, а также включает в себя каждый из меньших входящих в него диапазонов, образованных всеми различными возможными комбинациями их конечных точек и попадающими внутрь их целых и дробных значений, которые образуют подгруппы большей группы значений в пределах указанного диапазона, в той же мере, как и в случае явного задания каждого из подобных меньших диапазонов. Когда в настоящем документе диапазон числовых значений задан как больший заданной величины, указанный диапазон тем не менее конечен и ограничен на своем верхнем конце некоторой величиной, которая возможна в контексте описанного в настоящем документе изобретения. Когда в настоящем документе диапазон числовых значений задан как меньший по сравнению с заданной величиной, указанный диапазон тем не менее ограничен на своем нижнем конце некоторой ненулевой величиной. Предполагается, что объем изобретения не будет ограничен конкретными значениями, перечисленными при определении диапазона значений. Все диапазоны являются включающими и комбинируемыми.

[0013] Когда значения указаны как приблизительные с использованием предшествующего слова «около», следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант осуществления. Ссылка на то или иное конкретное

численное значение включает по меньшей мере это конкретное значение, если только контекстом четко не предусмотрено иное.

[0014] Следует понимать, что некоторые признаки раскрытых композиций и способов, которые для ясности описаны в настоящем документе в контексте отдельных вариантов осуществления, могут быть также представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки раскрытых композиций и способов, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, могут быть также представлены отдельно или в любой подкомбинации.

[0015] Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают в себя и множественное число.

[0016] В настоящем описании и формуле изобретения используют различные термины, относящиеся к аспектам настоящего описания. Такие термины должны иметь обычное для них значение в данной области техники, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать согласно приведенным в настоящем документе определениям.

[0017] Термин «около», используемый в настоящем документе в отношении числовых диапазонов, пороговых или конкретных значений, используется для обозначения того, что перечисленные значения могут варьировать вплоть до 10% от указанного значения. Поскольку многие числовые значения, используемые в настоящем документе, определяются экспериментально, специалисты в данной области должны понимать, что такие определения могут, и часто будут, варьировать в различных экспериментах. Используемые в настоящем документе значения не следует считать чрезмерно ограничивающими в силу этой присущей им вариативности. Таким образом, термин «около» используется для охвата вариаций $\pm 10\%$ или менее, вариаций $\pm 5\%$ или менее, вариаций $\pm 1\%$ или менее, вариаций $\pm 0,5\%$ или менее или вариаций $\pm 0,1\%$ или менее от указанного значения.

[0018] Предполагается, что термин «содержащий» включает в себя примеры, которые охватываются терминами «состоящий по существу из» и «состоящий из»; аналогичным образом предполагается, что термин «состоящий по существу из» включает в себя примеры, которые охватываются термином «состоящий из».

[0019] Термин «антитело» и подобные термины понимаются в широком смысле и включают в себя молекулы иммуноглобулинов или их фрагменты, включая моноклональные антитела (такие как мышинные, человеческие, адаптированные для

человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела), фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела и одноцепочечные антитела.

[0020] Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяют на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

[0021] Термин «фрагмент антитела» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающие свойства родительского полноразмерного антитела. Примерами фрагментов антител служат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3; определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3; переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают в себя: фрагмент Fab — моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, постоянного легкого (CL) и (постоянного тяжелого 1) CH1 доменов; фрагмент F(ab)₂ — бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; и фрагмент доменного антитела (dAb) (Ward *et al.*, Nature 341:544–546, 1989), который состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными конструктами одноцепочечными антител, с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях №№ WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047. Эти фрагменты антител получают с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области, и скрининг фрагментов на пригодность проводят таким же образом, как и для полноразмерных антител.

[0022] Вариабельная область антитела состоит из «каркасной» области, разделенной тремя «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов: (i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat, J Exp Med 132:211–50, 1970; Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); и (ii) «гипервариабельные области» (HVR или HV), три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям вариабельных доменов антитела, которые являются по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, Mol. Biol 196:901–17, 1987). Другие термины включают в себя IMGT-CDR (Lefranc *et al.*, Dev Comparat Immunol 27:55–77, 2003) и «использование остатков, определяющих специфичность» (SDRU) (Almagro Mol Recognit 17:132–43, 2004). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (www.imgt.org) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в Lefranc *et al.*, Dev Comparat Immunol 27:55–77, 2003.

[0023] Термин «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела отображает одинарную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или в случае биспецифического моноклонального антитела двойную специфичность связывания к двум отдельным эпитопам. Следовательно, «моноклональное антитело» относится к популяции антител с одинаковым аминокислотным составом в каждой тяжелой и каждой легкой цепи, за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина в тяжелой цепи антитела. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, или моновалентным, бивалентным или мультивалентным. Биспецифическое антитело включено в термин «моноклональное антитело».

[0024] Термин «эпитоп» означает часть антигена, с которым специфически связывает антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь

конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, формирующих конформационный пространственный блок. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка.

[0025] Термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например заменами, вставками или делециями.

[0026] Выражение «в комбинации с» означает, что два или более терапевтических средства могут быть введены субъекту вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

[0027] Термины «лечить», «лечение» и подобные термины относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам и включают в себя уменьшение тяжести и/или частоты симптомов, устранение симптомов и/или первопричины симптомов, снижение частоты или вероятности симптомов и/или их первопричины, нормализацию или устранение повреждений, вызванных, прямо или косвенно, злокачественной опухолью. Лечение также включает продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью субъекта, не получающего лечения. Подлежащие лечению субъекты включают тех, которые имеют состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к развитию состояния или расстройства, или тех, у которых такое состояние или расстройство необходимо предотвратить.

[0028] Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству в рамках описанной комбинированной терапии, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, и от способности комбинированной терапии вызывать требуемый ответ у субъекта. Примеры показателей терапевтически эффективного количества включают, например, улучшение самочувствия пациента, снижение опухолевой нагрузки, остановку или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки тела.

[0029] Термин «рак», используемый в настоящем документе, определяется как заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аномальных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровотоки и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных видов рака включают в себя, без ограничений, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкемию, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких (НМРЛ)) и т. п.

[0030] Термин «пациент» включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин «не относящееся к человеку животное» включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины «индивид» и «пациент» в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

[0031] Описание

[0032] В настоящем документе описаны стабильные водные фармацевтические композиции, содержащие биспецифическое антитело к EGFR/ c-Met.

[0033] В некоторых аспектах стабильная водная фармацевтическая композиция содержит биспецифическое антитело к EGFR/c-Met, содержащее первую тяжелую цепь (HC1), содержащую переменную область 1 HC1 (VH1); первую легкую цепь (LC1), содержащую переменную область 1 легкой цепи (VL1); вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую переменную область 2 HC2 (VH2); и вторую легкую цепь (LC2), содержащую переменную область 2 легкой цепи (VL2), причем VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно (см. таблицу 14). Стабильная водная фармацевтическая композиция также содержит гистидин и/или фармацевтически приемлемую соль гистидина, сахарозу,

полисорбат 80 (PS80), метионин и этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и имеет рН от около 5,2 до около 6,2. Стабильные водные фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, дополнительно содержат от около 44 мг/мл до около 56 мг/мл биспецифического антитела к EGFR-cMet, от около 8 мМ до около 12 мМ гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина, от около 6,8% (масс./об.) до около 10,2% (масс./об.) сахарозы, от около 0,036% (масс./об.) до около 0,084% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80), от около 0,8 мг/мл до около 1,2 мг/мл метионина, от около 16 мкг/мл до около 24 мкг/мл EDTA; и имеют рН от около 5,2 до около 6,2.

[0034] В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь (HC1) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 3 HC1 (CH3 HC1) и вариабельную область 1 HC1 (VH1). В некоторых вариантах осуществления вторая тяжелая цепь (HC2) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 3 HC2 (CH3 HC2) и вариабельную область 2 HC2 (VH2).

В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь (HC1) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 3 HC1 (CH3 HC1) и вариабельную область 1 HC1 (VH1), а вторая тяжелая цепь (HC2) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 3 HC2 (CH3 HC2) и вариабельную область 2 HC2 (VH2). В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь (HC1) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 2 и константный домен 3 HC1 (CH2–CH3 HC1) и вариабельную область 1 HC1 (VH1). В некоторых вариантах осуществления вторая тяжелая цепь (HC2) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 2 и константный домен 3 HC2 (CH2–CH3 HC2) и вариабельную область 2 HC2 (VH2).

В некоторых вариантах осуществления, первая тяжелая цепь (HC1) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 2 и константный домен 3 HC1 (CH2–CH3 HC1) и вариабельную область 1 HC1 (VH1), а вторая тяжелая цепь (HC2) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 2 и константный домен 3 HC2 (CH2–CH3 HC2) и вариабельную область 2 HC2 (VH2).

[0035] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет асимметричные стабилизирующие мутации в области CH2–CH3 HC1, в области CH2–CH3 HC2 или в обеих. Термин «асимметричные стабилизирующие мутации» относится к мутациям в первой области CH2–CH3 и во второй области

CH2–CH3, которые находятся в различных положениях в первой и во второй области CH2–CH3 и способствуют (например, путем стабилизации) образованию гетеродимера между первой областью CH2–CH3 и второй областью CH2–CH3 по сравнению с образованием гомодимера между первой областью CH2–CH3 или второй областью CH2–CH3. Примерами асимметричных стабилизирующих мутаций в области CH2–CH3 HC1 и области CH2–CH3 HC2 или в области CH2–CH3 HC2 и области CH2–CH3 HC1 являются (причем нумерация остатков соответствует индексу ЕС):

F405L и K409R соответственно;

дикого типа и F405L/R409K соответственно;

T366W и T366S/L368A/Y407V соответственно;

T366Y/F405A и T394W/Y407T соответственно;

T366W/F405W и T394S/Y407A соответственно;

F405W/Y407A и T366W/T394S соответственно;

L351Y/F405A/Y407V и T394W соответственно;

T366I/K392M/T394W и F405A/Y407V соответственно;

T366L/K392M/T394W и F405A/Y407V соответственно;

L351Y/Y407A и T366A/K409F соответственно;

L351Y/Y407A и T366V/K409F соответственно;

Y407A и T366A/K409F соответственно;

D399K/E356K и K409D/K392D соответственно; или

D399K/E356K/E357K и K409D/K392D/K370 соответственно.

[0036] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область LC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14 (см. таблицу 14).

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет асимметричные стабилизирующие мутации в области CH2–CH3 HC1, в области CH2–CH3 HC2 или в обеих. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит K409R в связывающемся с c-Met плече и F405L в связывающемся с EGFR плече.

[0037] В некоторых аспектах биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC2, содержащую аминокислотную

последовательность с SEQ ID NO: 15, и вариабельную область LC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16 (см. таблицу 14).

[0038] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь 1 (HC1) содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, а HC2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19 (см. таблицу 14).

[0039] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь 1 (LC1) содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18, а LC2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20 (см. таблицу 14).

[0040] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR-cMet представляет собой амивантамаб.

[0041] Согласно некоторым аспектам, стабильная водная фармацевтическая композиция содержит биспецифическое антитело к EGFR-cMet в концентрации около: 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл, 60 мг/мл, 61 мг/мл, 62 мг/мл, 63 мг/мл, 64 мг/мл или 65 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR-cMet имеет концентрацию около 50 мг/мл.

[0042] Согласно некоторым аспектам, стабильная водная фармацевтическая композиция содержит гистидин и/или фармацевтически приемлемую соль гистидина в концентрации около: 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM или 15 mM. В некоторых вариантах осуществления гистидин и/или фармацевтически приемлемые соли гистидина имеют концентрацию около 10 mM. В другом варианте осуществления гистидин и/или фармацевтически приемлемая соль гистидина содержит L-гистидин и моногидрат гидрохлорида L-гистидина.

[0043] Согласно некоторым аспектам, стабильная водная фармацевтическая композиция содержит сахарозу в концентрации (процентное отношение массы к объему (% масс./об.)) около: 6,0%, 6,1%, 6,2%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,6%, 6,7%, 6,8%, 6,9%, 7,0%, 7,1%, 7,2%, 7,3%, 7,4%, 7,5%, 7,6%, 7,7%, 7,8%, 7,9%, 8,0%, 8,1%, 8,2%, 8,3%, 8,4%, 8,5%, 8,6%, 8,7%, 8,8%, 9,9%, 10,0%, 10,1%, 10,2%, 10,3%, 10,4%, 10,5%, 10,6%, 10,7%, 10,8%, 10,9% или 11,0%. В некоторых вариантах осуществления стабильная водная фармацевтическая композиция содержит около 8,5% (масс./об.) сахарозы.

[0044] Согласно некоторым аспектам, стабильная водная фармацевтическая композиция содержит полисорбат 80 (PS80) в концентрации (масс./об.) около:

0,036%, 0,037%, 0,038%, 0,039%, 0,040%, 0,041%, 0,042%, 0,043%, 0,044%, 0,045%,
0,046%, 0,047%, 0,048%, 0,049%, 0,050%, 0,051%, 0,052%, 0,053%, 0,054%, 0,055%,
5 0,056%, 0,057%, 0,058%, 0,059%, 0,060%, 0,061%, 0,062%, 0,063%, 0,064%, 0,065%,
0,066%, 0,067%, 0,068%, 0,069%, 0,070%, 0,071%, 0,072%, 0,073%, 0,074%, 0,075%,
0,080%, 0,081%, 0,082%, 0,083%, 0,084%, 0,085%, 0,086%, 0,087%, 0,088%, 0,089%,
0,090%, 0,091%, 0,092%, 0,093%, 0,094% или 0,095%. В некоторых вариантах
10 осуществления стабильная водная фармацевтическая композиция содержит около
0,06% (масс./об.) PS80.

[0045] Согласно некоторым аспектам, стабильная водная фармацевтическая композиция содержит метионин в концентрации около: 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл,

0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1,0 мг/мл,
1,1 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,7 мг/мл, 1,8 мг/мл,
15 1,9 мг/мл или 2,0 мг/мл. В одном варианте осуществления метионин имеет
концентрацию около 1,0 мг/мл.

[0046] Согласно некоторым аспектам, стабильная водная фармацевтическая композиция содержит EDTA в концентрации около: 10 мкг/мл, 11 мкг/мл, 12 мкг/мл,
13 мкг/мл, 14 мкг/мл, 15 мкг/мл, 16 мкг/мл, 17 мкг/мл, 18 мкг/мл, 19 мкг/мл,
20 20 мкг/мл, 21 мкг/мл, 22 мкг/мл, 23 мкг/мл, 24 мкг/мл, 25 мкг/мл, 26 мкг/мл,
27 мкг/мл, 28 мкг/мл, 29 мкг/мл или 30 мкг/мл. В одном варианте осуществления
EDTA имеет концентрацию около 20 мкг/мл.

[0047] Срок хранения

[0048] В некоторых вариантах осуществления стабильность ЛПП определяют
25 после хранения в течение установленного периода времени. В некоторых вариантах
осуществления ЛПП хранят около 3 месяцев или более, около 6 месяцев или более,
около 12 месяцев или более, около 1,5 года или более, около 2 лет или более, около
2,5 года или более, около 3 лет или более, около 3,5 года или более, около 4 лет или
более, около 4,5 года или более, около 5 лет или более, около 6 лет или более, около
30 7 лет или более, около 8 лет или более, около 9 лет или более или около 10 лет или
более. В некоторых вариантах осуществления ЛПП хранят около 12 месяцев или
более, около 1,5 года или более, около 2 лет или более, около 2,5 года или более или
около 3 лет или более. В некоторых вариантах осуществления ЛПП хранят около 2 лет
или более.

[0049] Температура

[0050] В некоторых вариантах осуществления ЛП стабилен после хранения при конкретной температуре в течение установленного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления температура находится в диапазоне около: -10–50 °C, 0–25 °C, 1–20 °C, 1–15 °C, 2–10 °C или 2–5 °C. В некоторых вариантах осуществления температура находится в диапазоне около: 2–8 °C. В некоторых вариантах осуществления температура составляет около: -10 °C, -9 °C, -8 °C, -7 °C, -6 °C, -5 °C, -4 °C, -3 °C, -2 °C, -1 °C, 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C или 50 °C.

[0051] В некоторых вариантах осуществления ЛП стабилен после хранения в течение около 12 месяцев или более или в течение около 2 лет или более и при температуре от около 2 °C до около 8 °C. В некоторых вариантах осуществления ЛП стабилен после хранения в течение около 12 месяцев или более или в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В некоторых вариантах осуществления ЛП стабилен после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C.

[0052] Стабильность описанных в настоящее время водных фармацевтических композиций, также называемых лекарственным препаратом (ЛП), определяют на основании конкретного количества или соотношения биспецифического антитела к EGFR-cMet и других составляющих ЛП, как представлено в настоящем документе (таких как, без ограничений, гистидин и/или фармацевтически приемлемые соли гистидина, сахароза, PS80, метионин и EDTA), а также оценки различных факторов. Эти факторы включают в себя, без ограничений, цвет раствора, pH, мутность, число невидимых частиц, процентный показатель агликозилированной тяжелой цепи (AGHC), процентный показатель нового (-ых) пика (-ов), процентное содержание высокомолекулярных соединений (HMWS), процентное содержание низкомолекулярных соединений (LMWS), процентный показатель суммы кислотных пиков, процентный показатель суммы щелочных пиков, концентрацию белка, процентный показатель активности связывания с EGFR, процентный показатель активности связывания с cMet и/или процентное содержание PS80.

[0053] Стабильный ЛП, как описано в настоящем документе, должен толковаться как требующий наличия не всех факторов, перечисленных в настоящем документе, а, скорее, по меньшей мере одного, по меньшей мере двух или по меньшей мере трех или более из этих факторов. В некоторых вариантах осуществления стабильный описанный ЛП показывает приведенные далее результаты для по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех или более факторов, подробно перечисленных ниже в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления стабильный ЛП показывает приведенные далее результаты для всех факторов, подробно перечисленных ниже в настоящем документе.

[0054] Цвет раствора

[0055] Цвет раствора ЛП отслеживается и может быть оценен для подтверждения того, что внешний вид раствора соответствует предыдущим партиям при выпуске и в течение срока годности. Цвет раствора ЛП может отражать стабильность. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется по цвету раствора, варьирующемуся от бесцветного до около BY2 или менее, до около BY4 или менее, до около B2 или менее, до около B4 или менее, до около Y2 или менее или до около Y4 или менее, как описано в статье 2.2.2 Европейской фармакопеи «Степень окрашивания жидкостей», European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition monograph number 20202, July 2019.

[0056] В одном варианте осуществления стабильность определяется по цвету раствора от бесцветного до около BY2 или менее, около B2 или менее, около Y2 или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте осуществления определяется по цвету раствора от бесцветного до около BY5 или менее, до около B5 или менее, до около Y5 или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.

[0057] pH

[0058] Измерение pH раствора ЛП позволяет подтвердить, что он

соответствует предыдущим партиям ЛП при выпуске и в течение срока годности.

В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется, когда его значение pH составляет около: 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2,

6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0. В одном варианте осуществления pH ЛП

составляет около 5,7 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при

температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и

при температуре около 5 °C. В одном варианте осуществления pH ЛП находится в

диапазоне от около 5,0 до около 6,4 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или

более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет

или более и при температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте

осуществления стабильность ЛП определяется, когда его pH находится в диапазоне

от около 5,2 до около 6,2 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при

температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при

температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и

при температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления

стабильность ЛП определяется, когда его pH находится в диапазоне от около 5,4 до

около 6,0 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре

около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре

около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при

температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления

стабильность ЛП определяется, когда его pH находится в диапазоне от около 5,3 до

около 6,1 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре

около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре

около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при

температуре около 5 °C.

[0059] Мутность

[0060] Определение мутности позволяет измерить наличие частиц в растворе

ЛП, чтобы обеспечить соответствие предыдущим партиям ЛП и действующим

справочным руководствам при выпуске и в течение срока годности. В одном

варианте осуществления стабильность ЛП определяется, когда его значение

мутности составляет около: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нефелометрических единиц мутности (NTU) после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение

5 около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется, когда его значение мутности составляет около или менее чем менее 18 NTU после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение

10 около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется, когда его значение мутности составляет около или менее чем менее 13 NTU после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение

15 около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется, когда его значение мутности составляет около или менее чем менее 8 NTU после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в

20 течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется, когда его значение мутности составляет около или менее чем менее 6 NTU после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после

25 хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0061] Анализ на частицы

[0062] Для стабильности ЛП устанавливается конкретный порог загрязнения частицами, основанный на среднем числе невидимых частиц. В одном варианте осуществления среднее число частиц, присутствующих в тестируемых единицах ЛП,

30 не должно превышать 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или 6000 на контейнер для размера частиц, равного 10 мкм или более. В одном варианте осуществления среднее число частиц, присутствующих в тестируемых единицах ЛП, не должно превышать 6000 на контейнер для размера частиц, равного 10 мкм или более. В одном варианте осуществления среднее число

частиц, присутствующих в тестируемых единицах ЛП, не должно превышать 100, 200, 300, 400, 500 или 600 на контейнер для размера частиц, равного 25 мкм или более. В одном варианте осуществления среднее число частиц, присутствующих в тестируемых единицах ЛП, не должно превышать 600 на контейнер для размера частиц, равного 25 мкм или более.

[0063] Условия cSDS-электрофореза

[0064] Капиллярный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (cSDS-электрофорез) в восстанавливающих условиях, как и гелевый ДСН-ПААГ-электрофорез, представляет собой способ разделения денатурированных белков на основании молекулярной массы. Этот процесс позволяет количественно определять чистоту ЛП и контролировать его стабильность при выпуске и в течение срока годности.

[0065] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется на основании различных результатов для переменных cSDS-электрофореза (например, процентной чистоты, агликозилированной тяжелой цепи (AGHC) или наличия нового пика), причем cSDS-электрофорез проводили в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.

[0066] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты, составляющее около: 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или около или равное 100% или любому значению из диапазона между указанными значениями.

[0067] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли AGHC, составляющее около: 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% или любое значение из диапазона между указанными значениями.

[0068] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как отсутствие в результатах cSDS-электрофореза нового пика (NNP) более 0,5%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9% или более 2% по сравнению с необработанным эталонным материалом.

[0069] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты около 88% или более, AGHC около 11% или более и отсутствие нового пика более 1,5% по сравнению с эталонным материалом.

В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты около 91% или более, AGHC около 8% или менее и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты около 94% или более, AGHC около 5% или менее и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты около 93% или более, AGHC около 6% или менее и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом.

[0070] Капиллярный ДСН-ПААГ-электрофорез (сSDS-электрофорез) в невосстанавливающих условиях, как и гелевый ДСН-ПААГ-электрофорез, представляет собой способ разделения белков на основании молекулярной массы. Этот процесс позволяет количественно определять чистоту ЛП и контролировать его стабильность при выпуске и в течение срока годности.

[0071] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется на основании различных результатов для переменных сSDS-электрофореза (например, процентной чистоты или наличия нового пика), причем сSDS-электрофорез проводили в невосстанавливающих условиях после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.

[0072] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты, составляющее около: 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или около или равное 100% или любому значению из диапазона между указанными значениями.

[0073] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как отсутствие в результатах сSDS-электрофореза нового пика более 0,5%, 0,8%, 0,9%,

1,0%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9% или более 2% по сравнению с необработанным эталонным материалом.

[0074] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты около 90% или более и отсутствие нового пика более 1,5% по сравнению с эталонным материалом. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты около 94% или более и отсутствие нового пика более 1,2% по сравнению с эталонным материалом. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение процентной чистоты около 97% или более и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом

[0075] Результаты эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭВЭЖХ) отражают стабильность

[0076] Процедура ЭВЭЖХ позволяет оценивать чистоту ЛП и контролировать его стабильность в неденатурирующих условиях при выпуске и в течение срока годности.

[0077] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется на основании различных результатов для переменных ЭВЭЖХ, таких как основной компонент (МС), высокомолекулярные соединения (HMWS) или низкомолекулярные соединения (LMWS)), после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0078] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МС, составляющее около: 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или равное около 100% или любому значению из диапазона между указанными значениями. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МС около 90% или более. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МС около 92% или более. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МС около 95% или более. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МС около 97% или более.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли МС около 98% или более.

[0079] В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли НМWS, составляющее около: 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% или любое значение из диапазона между указанными значениями. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли НМWS около 10% или менее. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли НМWS около 8% или менее. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли НМWS около 5% или менее. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли НМWS около 3% или менее. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли НМWS около 2% или менее.

[0080] В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли LMWS около: 0,1%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% или 10%. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли LMWS около 5% или менее. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли LMWS около 2% или менее. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли LMWS около 1% или менее.

[0081] Капиллярное изoeлектрическое фокусирование (КИЭФ)

[0082] КИЭФ, как и методы гель-электрофореза с изoeлектрическим фокусированием (ИЭФ) дает возможность разделять белки на основе общего заряда или изoeлектрической точки (pI). Эта процедура позволяет контролировать распределение зарядовых изоформ лекарственного препарата при высвобождении и в течение срока годности. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется на основании различных результатов для переменных КИЭФ, таких как главный пик (MP), сумма кислотных пиков или сумма щелочных пиков, после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.

[0083] В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение доли MP при выполнении КИЭФ, составляющее около: 20%, 25%, 30%,

35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% или любое значение из диапазона между указанными значениями после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МР при выполнении КИЭФ, находящееся в диапазоне от около 30% до около 90% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МР при выполнении КИЭФ, находящееся в диапазоне от около 37% до около 87% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МР при выполнении КИЭФ, находящееся в диапазоне от около 47% до около 87% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МР при выполнении КИЭФ, находящееся в диапазоне от около 46% до около 87% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МР при выполнении КИЭФ, находящееся в диапазоне от около 57% до около 87% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение доли МР при выполнении КИЭФ, находящееся в диапазоне от около 66% до около 83% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0084] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы кислотных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая около: 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% или любое значение из диапазона между указанными значениями

после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы кислотных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая от около 5% до около 65% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В другом варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы кислотных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая от около 10% до около 60% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы кислотных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая от около 10% до около 50% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы кислотных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая от около 10 до около 50% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы кислотных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая от около 10% до около 40% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0085] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы щелочных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая около: 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% или любое значение из диапазона между указанными значениями после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы щелочных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая около 12% или менее после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы щелочных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая около 10% или менее после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы щелочных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая менее или около 10% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы щелочных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая менее или около 8% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы щелочных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая менее или около 8% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как величина общей суммы щелочных пиков при выполнении КИЭФ, составляющая менее или около 5% после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0086] Концентрация белка

[0087] Концентрация белка в ЛП позволяет проверить его соответствие предыдущим партиям ЛП при выпуске и в течение срока годности. Количественное определение концентрации белка может быть выполнено посредством измерения поглощения ультрафиолетового (УФ) света раствором лекарственного препарата при 280 нм (A280).

[0088] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение концентрации белка около: 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл, 60 мг/мл, 61 мг/мл, 62 мг/мл, 63 мг/мл, 64 мг/мл или 65 мг/мл после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение концентрации белка от около 40 мг/мл до около 60 мг/мл после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение концентрации белка от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение концентрации белка от около 43 мг/мл до около 57 мг/мл после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение концентрации белка от около 47 мг/мл до около 54 мг/мл после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение концентрации белка от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0089] Пептидное картирование

[0090] Посттрансляционные модификации (ПТМ), такие как окисление, дезамидирование и изомеризация, представляют собой ферментативные модификации, которые могут быть обнаружены в структуре антитела. В некоторых вариантах осуществления стабильность ПЛ оценивают на основании уровня ПТМ в антителе. Тестируемые изделия подвергают ферментативному расщеплению для получения пептидных сегментов. Затем оценку этих пептидов проводят, например, посредством масс-спектрометрии (МС), tandemной масс-спектрометрии (МС/МС) или сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС). Каждую анализируемую пептидную последовательность идентифицируют относительно ее известного положения в общей структуре антитела. Посттрансляционные модификации определяют путем сравнения измеренной массы идентифицированной пептидной последовательности с ее ожидаемой массой.

[0091] Эффективность лекарственного препарата

[0092] В условиях *in vitro* связывание ЛП с EGFR и/или c-Met позволяет оценить уровень стабильности ЛП. Это связывание может быть оценено с применением, без ограничений, гомогенного конкурентного анализа резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET).

[0093] Активность связывания с EGFR

[0094] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение активности связывания с EGFR относительно эталона, составляющее около: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% или 200% или любое значение из диапазона между указанными значениями после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение активности связывания с EGFR, находящееся в диапазоне от около 50% до около 150% относительно эталона после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в

течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение активности связывания с EGFR, находящееся в диапазоне от около 60% до около 140% относительно эталона после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение активности связывания с EGFR, находящееся в диапазоне от около 60% до около 140% относительно эталона после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение активности связывания с EGFR, находящееся в диапазоне от около 65% до около 130% относительно эталона после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение активности связывания с EGFR, находящееся в диапазоне от около 80% до около 120% относительно эталона после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение активности связывания с EGFR, находящееся в диапазоне от около 70% до около 130% относительно эталона после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0095] Результаты измерения активности связывания с cMet отражают стабильность

[0096] В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение активности связывания с cMet относительно эталона, составляющее около: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% или 200% или любое значение из диапазона между указанными значениями после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП

определяется как значение активности связывания с сMet, находящееся в диапазоне от около 50% до около 150% относительно эталона после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение активности связывания с сMet, находящееся в диапазоне от около 60% до около 140% относительно эталона после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение активности связывания с сMet, находящееся в диапазоне от около 60% до около 140% относительно эталона после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение активности связывания с сMet, находящееся в диапазоне от около 65% до около 125% относительно эталона после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение активности связывания с сMet, находящееся в диапазоне от около 80% до около 120% относительно эталона после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение активности связывания с сMet, находящееся в диапазоне от около 76% до около 125% относительно эталона после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0097] Полисорбат 80 (PS80)

[0098] В одном варианте осуществления стабильность ЛП определяется как значение концентрации PS80 в процентах массы к объему, составляющее около: 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,11%, 0,12%, 0,13%, 0,14% или 0,15% или любое значение из диапазона между указанными значениями после хранения ЛП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при

температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение концентрации PS80 от около 0,02% до около 0,1% после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение концентрации PS80 от около 0,03% до около 0,09%. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение концентрации PS80 от около 0,04% до около 0,08% после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение концентрации PS80 от около 0,02% до около 0,09%. В предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение концентрации PS80 от около 0,03% до около 0,08% после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение концентрации PS80 от около 0,05% до около 0,08% после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность ЛПП определяется как значение концентрации PS80 от около 0,04% до около 0,08% после хранения ЛПП в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[0099] В одном варианте осуществления общий объем стабильной водной фармацевтической композиции (или ЛПП) находится в диапазоне от около 5 мл до около 10 мл. В одном варианте осуществления общий объем стабильной водной фармацевтической композиции (или ЛПП) находится в диапазоне от около 0,5 мл до около 20 мл, от около 1 мл до около 15 мл, от около 5 мл до около 10 мл или от около 6 мл до около 8 мл. В одном варианте осуществления общий объем стабильной водной фармацевтической композиции составляет около: 0,5 мл, 0,6 мл, 0,7 мл, 0,8 мл, 0,9 мл, 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 18 мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл или 30 мл или любое значение из диапазона между указанными значениями.

[00100] Способы

[00101] В настоящем документе представлен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легких. В некоторых вариантах осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких (НМРЛ). Способ включает в себя введение стабильной водной фармацевтической композиции субъекту, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления введение осуществляют внутривенно.

[00102] Также в настоящем документе представлен способ получения стабильной водной фармацевтической композиции биспецифического антитела, нацеленного на EGFR и cMet. Биспецифическое антитело, нацеленное на EGFR и cMet, используемое в данном способе, содержит первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область 1 HC1 (VH1); первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область 1 легкой цепи (VL1); вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область 2 HC2 (VH2); и вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область 2 легкой цепи (VL2), причем VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно (см. таблицу 14). Способ также включает в себя объединение композиции, содержащей около 50 мг/мл биспецифического антитела, около 10 мМ гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина, около 8,5% сахарозы и около 1 мг/мл L-метионина с полисорбатом 80 до конечной концентрации около 0,06% (масс./об.) и EDTA до конечной концентрации около 20 мкг/мл, причем стабильная водная фармацевтическая композиция имеет pH около 5,7.

[00103] В одном варианте осуществления первая тяжелая цепь (HC1) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 3 HC1 (HC1

CH3) и переменную область 1 HC1 (VH1). В другом варианте осуществления вторая тяжелая цепь (HC2) биспецифического антитела к EGFR-cMet содержит константный домен 3 HC2 (CH3 HC2) и переменную область 2 HC2 (VH2).

[00104] В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область LC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14 (см. таблицу 14).

[00105] В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и переменную область LC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16 (см. таблицу 14).

[00106] В одном варианте осуществления HC1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, а HC2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19 (см. таблицу 14).

[00107] В другом варианте осуществления LC1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18, а LC2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20 (см. таблицу 14).

[00108] В одном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя фильтрацию стабильной водной фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления фильтрацию выполняют с помощью одного или более стерилизующих фильтров 0,22 мкм. В одном варианте осуществления стерилизующий фильтр имеет размер пор около: 0,10 мкм, 0,15 мкм, 0,20 мкм, 0,25 мкм, 0,30 мкм, 0,35 мкм, 0,40 мкм, 0,45 мкм, 0,50 мкм, 0,55 мкм, 0,60 мкм, 0,65 мкм, 0,70 мкм или 0,75 мкм.

[00109] Стабильные водные фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть упакованы в наборы, контейнеры, упаковки, диспенсеры или флаконы.

[00110] В настоящем документе представлен набор, содержащий описанный стабильный водный фармацевтический препарат и инструкции по его применению.

[00111] Также в настоящем документе представлено изделие, содержащее контейнер с описанной стабильной водной фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой флакон с пробкой, прокалываемой шприцем.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00112] В настоящем документе представлены иллюстративные варианты осуществления описанной технологии. Эти варианты осуществления являются лишь иллюстративными и не ограничивают объем настоящего описания или прилагаемой формулы изобретения.

Вариант осуществления 1. Стабильная водная фармацевтическая композиция, содержащая:

a) от около 44 мг/мл до около 56 мг/мл биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met), причем биспецифическое антитело содержит:

первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область 1 HC1 (VH1); первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область 1 легкой цепи (VL1); вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область 2 HC2 (VH2); и вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область 2 легкой цепи (VL2), при этом VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно;

b) от около 8 mM до около 12 mM гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина,

c) от около 6,8% (масс./об.) до около 10,2% масс./об. сахарозы,

d) от около 0,036% (масс./об.) до около 0,084% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80),

e) от около 0,8 мг/мл до около 1,2 мг/мл метионина,

f) от около 16 мкг/мл до около 24 мкг/мл этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); и

g) pH от около 5,2 до около 6,2.

[00113] Вариант осуществления 2. Стабильная водная фармацевтическая композиция по варианту осуществления 1, в которой биспецифическое антитело к EGFR-сMet содержит вариабельную область HC1, содержащую аминокислотную

последовательность с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область LC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.

[00114] Вариант осуществления 3. Стабильная водная фармацевтическая композиция по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, в которой биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит вариабельную область HC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и вариабельную область LC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

[00115] Вариант осуществления 4. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–3, в которой HC1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, а LC1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

[00116] Вариант осуществления 5. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–4, в которой HC2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19, а LC2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20.

[00117] Вариант осуществления 6. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–5, в которой биспецифическое антитело к EGFR-cMet представляет собой амивантамаб.

[00118] Вариант осуществления 7. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–6, в которой биспецифическое антитело к EGFR-cMet имеет концентрацию около 50 мг/мл.

[00119] Вариант осуществления 8. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–7, в которой гистидин и/или фармацевтически приемлемая соль гистидина имеют концентрацию около 10 mM.

[00120] Вариант осуществления 9. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–8, в которой гистидин и/или фармацевтически приемлемая соль гистидина содержит L-гистидин и моногидрат гидрохлорида L-гистидина.

[00121] Вариант осуществления 10. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–9, содержащая около 8,5% (масс./об.) сахарозы.

[00122] Вариант осуществления 11. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–10, содержащая около 0,06% (масс./об.) PS80.

[00123] Вариант осуществления 12. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–11, в которой метионин имеет концентрацию около 1 мг/мл.

[00124] Вариант осуществления 13. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–12, в которой EDTA имеет концентрацию около 20 мкг/мл.

[00125] Вариант осуществления 14. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–13, pH которой составляет около 5,7.

[00126] Вариант осуществления 15. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–14, причем стабильность определяется на основании цвета раствора, pH, мутности, числа невидимых частиц, процентного показателя агликозилированной тяжелой цепи (AGHC), процентного показателя нового (-ых) пика (-ов), процентного содержания высокомолекулярных соединений (HMWS), процентного содержания низкомолекулярных соединений (LMWS), процентного показателя суммы кислотных пиков, процентного показателя суммы щелочных пиков, концентрации белка, процентного показателя активности связывания с EGFR, процентного показателя активности связывания с cMet, процентного содержания PS80 или любой их комбинации.

[00127] Вариант осуществления 15a. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–14, причем стабильность определяется на основании цвета раствора, pH, мутности, числа невидимых частиц, процентного показателя чистоты, процентного показателя агликозилированной тяжелой цепи (AGHC), процентного показателя нового (-ых) пика (-ов), измеряемого с помощью cSDS-электрофореза в восстанавливающих условиях, процентного показателя чистоты и нового (-ых) пика (-ов), измеряемого с помощью cSDS-электрофореза в невосстанавливающих условиях, процентного содержания высокомолекулярных соединений (HMWS), процентного содержания низкомолекулярных соединений (LMWS), процентного показателя суммы кислотных пиков, процентного показателя суммы щелочных пиков, концентрации белка, процентного показателя активности

связывания с EGFR, процентного показателя активности связывания с cMet, процентного содержания PS80 или любой их комбинации.

[00128] Вариант осуществления 15b. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–15, являющаяся стабильной при температуре около 2–8 °С в течение по меньшей мере двух лет.

[00129] Вариант осуществления 16. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–15, причем общий объем композиции находится в диапазоне от около 5 мл до около 10 мл.

[00130] Вариант осуществления 16a. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–14, содержащая 50 мг/мл биспецифического антитела к EGFR-cMet, 10 мМ гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина, 8,5% (масс./об.) сахарозы, 0,06% (масс./об.) PS80, 1 мг/мл метионина и 20 мкг/мл EDTA.

[00131] Вариант осуществления 17. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает в себя этапы, на которых вводят субъекту фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 1–16a.

[00132] Вариант осуществления 18. Способ по варианту осуществления 17, в котором введение осуществляют внутривенно.

[00133] Вариант осуществления 19. Способ получения стабильной водной фармацевтической композиции биспецифического антитела, нацеленного на EGFR и cMet, причем биспецифическое антитело, нацеленное на EGFR и cMet, содержит первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область 1 HC1 (VH1); первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область 1 легкой цепи (VL1); вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область 2 HC2 (VH2); и вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область 2 легкой цепи (VL2), при этом VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и VL2 содержит

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO:

10, 11 и 12 соответственно; при этом способ включает в себя этапы, на которых:
объединяют композицию, содержащую около 50 мг/мл биспецифического антитела,
около 10 мМ гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина, около
5 8,5% сахарозы и около 1 мг/мл L-метионина с полисорбатом 80 до конечной
концентрации около 0,06% (масс./об.) и EDTA до конечной концентрации около
20 мкг/мл, причем стабильная водная фармацевтическая композиция имеет pH
около 5,7.

[00134] Вариант осуществления 20. Способ по варианту осуществления 19,
10 в котором биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит вариabельную область
HC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и
вариabельную область LC1, содержащую аминокислотную последовательность с
SEQ ID NO: 14.

[00135] Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов
15 осуществления 19–21, в котором биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит
вариabельную область HC2, содержащую аминокислотную последовательность с
SEQ ID NO: 15, и вариabельную область LC2, содержащую аминокислотную
последовательность с SEQ ID NO: 16.

[00136] Вариант осуществления 22. Способ по любому из вариантов
20 осуществления 19–21, в котором антитело содержит тяжелую цепь 1 (HC1),
содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую
цепь 1 (LC1), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

[00137] Вариант осуществления 23. Способ по любому из вариантов
25 осуществления 19–22, в котором антитело содержит HC2, содержащую
аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19, и LC2, содержащую
аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20.

[00138] Вариант осуществления 24. Способ по любому из вариантов
осуществления 19–23, в котором антитело представляет собой амивантамаб.

[00139] Вариант осуществления 25. Набор, содержащий стабильную
30 водную фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 1–
16 и инструкции по ее применению.

[00140] Вариант осуществления 26. Изделие, содержащее контейнер со
стабильной водной фармацевтической композицией по любому из вариантов
осуществления 1–16.

[00141] Вариант осуществления 27. Изделие по варианту осуществления 26, в котором контейнер представляет собой флакон с пробкой, прокалываемой шприцем.

[00142] Вариант осуществления 28. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–16 для применения в лечении рака.

[00143] Вариант осуществления 29. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–16 для применения в приготовлении лекарственного средства.

[00144] Вариант осуществления 30. Применение фармацевтической композиции для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, посредством введения фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 1–16.

[00145] Вариант осуществления 31. Применение фармацевтической композиции по варианту осуществления 30, причем введение осуществляют внутривенно.

ПРИМЕРЫ

[00146] Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в данном документе вариантов осуществления. Целью примеров является иллюстрация, а не ограничение описанных вариантов осуществления.

[00147] Описание аналитических тестов, используемых в настоящем документе

[00148] Аналитические тесты — общая характеристика

[00149] Цвет раствора

[00150] Для лекарственного препарата отслеживают цвет раствора, чтобы оценить внешний вид и обеспечить его соответствие предыдущим партиям при выпуске и в течение срока годности. Цвет раствора может быть индикатором стабильности препарата. Для определения цвета раствора тестируемые образцы визуально сравнивают с определенным набором эталонных растворов.

[00151] Заданный объем жидкого содержимого переносят в предварительно маркированную ампулу тех же размеров, что и ампулы с эталонными растворами. Затем содержимое ампулы визуально сравнивают с цветными эталонными

растворами Европейской фармакопеи. Степень окрашивания определяют при рассеянном дневном свете, производя осмотр на белом фоне.

[00152] Цвет раствора, материал и способы

[00153] Материалы и способы соответствуют описанию в статье 2.2.2

- 5 Европейской фармакопеи «Степень окрашивания жидкостей», European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition monograph number 20202, July 2019. Если говорить вкратце, тестируемые изделия сравнивают с наборами цветных эталонных растворов В (коричневый), ВУ (коричневато-желтый) и У (желтый).

[00154] Результаты определения цвета раствора отражают стабильность.

- 10 В одном варианте осуществления стабильность определяется по цвету раствора от бесцветного до около ВУ2 или менее, около В2 или менее, около У2 или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.
- 15 В предпочтительном варианте осуществления определяется по цвету раствора от бесцветного до около ВУ4 или менее, до около В4 или менее, до около У4 или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.
- 20 В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется по цвету раствора от бесцветного до около ВУ5 или менее, до около В5 или менее, до около У5 или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и
- 25 при температуре около 5 °С.

[00155] pH

[00156] pH, материалы и способы — Ежедневно калибруемый электронный pH-метр со стандартизированным pH-электродом применяют для измерения pH тестируемых изделий. Перед тестированием все калибровочные растворы, эталонные буферы и тестируемые изделия доводят до равновесного состояния при 25 °С и во время его проведения поддерживают при этой температуре.

[00157] Результаты измерения pH отражают стабильность. В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение pH в диапазоне от 5,0 до 6,4 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С,

после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение pH в диапазоне от 5,2 до 6,2 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение pH в диапазоне от 5,4 до 6,0 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение pH в диапазоне от 5,3 до 6,1 после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00158] Мутность

[00159] Мутность, материалы и способы — Материалы и способы основаны на требованиях в статье 2.2.1 Европейской фармакопеи «Прозрачность и степень опалесценции жидкостей».

[00160] Результаты измерения мутности отражают стабильность. Результаты тестирования представлены в нефелометрических единицах мутности (NTU). В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение мутности около 18 NTU или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение мутности около 13 NTU или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение мутности около 8 NTU или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около

12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение мутности около 6 NTU или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00161] Аналитические тесты — твердые частицы

[00162] Твердые частицы (невидимые), материалы и способы — Все

материалы и способы соответствуют требованиям в статье <788> Фармакопеи США «Твердые частицы». Применяют соответствующий фармакопейным требованиям счетчик частиц в жидкости, оснащенный установкой для отбора проб по объему согласно Фармакопее. Перед тестированием тестируемые изделия доводят до равновесного состояния при комнатной температуре в течение по меньшей мере 60 минут, но не более 10 часов. Флаконы с тестируемыми изделиями объединяют в соответствии с требованиями в статье <788> Фармакопеи США «Твердые частицы». В соответствии с инструкциями в статье <788> Фармакопеи США «Твердые частицы» отбирают четыре порции объединенного тестируемого изделия, каждая соответствующего объема, и в каждой порции подсчитывают число частиц с размером, равным или превышающим 10 мкм и 25 мкм. Результаты, полученные для первой порции, не учитывают, а оставшиеся три результата используют для расчета среднего числа частиц для исследуемого препарата.

[00163] Анализ на содержание частиц (невидимых), результаты,

соответствующие требованиям Фармакопеи — Результаты тестирования должны соответствовать требованиям в статье <788> Фармакопеи США «Твердое вещество», в статье 2.9.19 Европейской фармакопеи и в статье XVII/6.07 Японской фармакопеи «Загрязнение частицами: невидимые частицы». Как таковое среднее число частиц, присутствующих в тестируемых единицах, не должно превышать 6000 частиц на контейнер для размера частиц, равного 10 мкм или более, и не должно превышать 600 частиц на контейнер для размера частиц, равного 25 мкм или более.

[00164] Аналитические тесты — чистота

[00165] Капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (cSDS-электрофорез) в восстанавливающих условиях

[00166] cSDS-электрофорез в восстанавливающих условиях, материалы и способы — Для анализа используют коммерческую систему капиллярного

электрофореза с оголенным капилляром из плавленого кварца, 50 мкм (внутренний диаметр) x 30,2 см (длина), в картридже с регулируемой температурой; капилляр оснащен окном обнаружения, прозрачным для ультрафиолетового света. Перед каждым введением капилляр промывают электрокинетически. Перед каждым анализом образца капилляр загружают просеивающей матрицей, состоящей из раствора запутанного полимера. В рамках способа применяют буфер для миграции SDS-MW Gel и сертифицированные стандарты молекулярной массы белков, варьирующиеся в диапазоне от приблизительно 10 до 148 кДа. Детектор ультрафиолетового абсорбционного спектрофотометра прибора установлен на длину волны 220 нм, и температура капилляра установлена на 25 °C. Для создания восстанавливающих условий обработки образца тестируемое изделие (в двух экземплярах) смешивают с ДСН и 2-меркаптоэтанолом и затем нагревают в течение определенного времени и при определенной температуре для полной денатурации и восстановления белка. Восстановленный образец вводят электрокинетически, посредством подачи на капилляр напряжения 5 кВ в течение приблизительно 20 секунд, и затем анализируют посредством подачи большего электрического поля в течение приблизительно 35 минут. Детекцию осуществляют по поглощению в дальней ультрафиолетовой области спектра, 220 нм. Данные о процентном показателе общего сигнала собирают для легкой цепи, тяжелой цепи и агликозилированной тяжелой цепи (AG HC).

[00167] Результаты cSDS-электрофореза в восстанавливающих условиях отражают стабильность. В одном варианте осуществления стабильность

определяется как значение процентной чистоты $\geq 88,0\%$, AG HC $\leq 11,0\%$ и отсутствие нового пика $> 1,5\%$ по сравнению с валидированным маточным раствором эталонного материала амивантамаба после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около

или более 91,0%, AG HC менее или около 8,0% и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около или более 91,0%, AG HC менее или около 8,0% и отсутствие нового пика более 1,2% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около или более 94,0%; AG HC менее или около 5,0% и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около или более 93,0%; AG HC менее или около 6,0% и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.

[00168] Капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (cSDS-электрофорез) в невосстанавливающих условиях

[00169] cSDS-электрофорез в невосстанавливающих условиях, материалы и способы — Для анализа используют коммерческую систему капиллярного электрофореза с оголенным капилляром из плавленого кварца, 50 мкм (внутренний диаметр) x 30,2 см (длина), в картридже с регулируемой температурой; капилляр оснащен окном обнаружения, прозрачным для ультрафиолетового света. Перед каждым введением капилляр промывают электрокинетически. Перед каждым анализом образца капилляр загружают просеивающей матрицей, состоящей из раствора запутанного полимера. В рамках способа применяют буфер для миграции SDS-MW Gel, сертифицированные стандарты молекулярной массы белков,

варьирующиеся в диапазоне от приблизительно 10 до 148 кДа, и образец валидированного эталонного материала амивантамаба. Детектор ультрафиолетового абсорбционного спектрофотометра прибора установлен на длину волны 220 нм, и температура капилляра установлена на 25 °С. Для создания невосстанавливающих условий обработки образца тестируемое изделие (в двух экземплярах) смешивают с ДСН и алкилирующим реагентом (N-этилмалеимидом, для предотвращения перестановки или реформации дисульфидных связей). Затем его нагревают в течение определенного времени и при определенной температуре, чтобы полностью денатурировать белок и минимизировать образование фрагментов и артефактных

полос. Невосстановленный образец вводят электрокинетически, посредством подачи на капилляр напряжения 5 кВ в течение приблизительно 20 секунд, и затем анализируют посредством подачи большего электрического поля в течение приблизительно 35 минут. Детекцию осуществляют по поглощению в дальней ультрафиолетовой области спектра, 220 нм. Собирают данные о процентном показателе общего сигнала. Данные также анализируют на наличие новых пиков по сравнению с эталонным материалом амивантамабом. Процентная чистота определяется как процентный показатель тяжелой цепи + процентный показатель легкой цепи.

[00170] Результаты cSDS-электрофореза в невосстанавливающих условиях отражают стабильность. В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около 88,0% или более и отсутствие нового пика более 1,5% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около 90,0% или более и отсутствие нового пика более 1,5% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около 90,0% или более и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после

хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной чистоты около 94,0% или более и отсутствие нового пика

5 более 1,2% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение

около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение процентной

10 чистоты около 94,0% или более и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления

15 стабильность определяется как значение процентной чистоты около 97,0% или более и отсутствие нового пика более 1,0% по сравнению с эталонным материалом после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

20 **[00171] Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ЭВЭЖХ)**

[00172] ЭВЭЖХ, материалы и способы — эталонный материал и тестируемые изделия разбавляют до целевой концентрации белка. Аналит объемом 20 мкл подают на эксклюзионную колонку 7,8 мм x 30 см на основе силикагеля с размером частиц

25 5 мкм, с диапазоном фракционирования от 10 до 500 кДа. В качестве подвижной фазы используют водный фосфатный буфер при скорости потока 0,7 мл/мин, а поглощение элюата непрерывно отслеживают при 280 нм. Мономер (основной компонент или основной пик), агрегаты (высокомолекулярные соединения, или HMWS) и фрагменты (низкомолекулярные соединения, или LMWS) разделяются на

30 колонке и элюируются с разными временами удержания. Количество этих соединений измеряют посредством контроля пика поглощения при 280 нм.

[00173] Результаты ЭВЭЖХ отражают стабильность

[00174] Основной компонент — В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение доли основного компонента около 90,0%

12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение доли HMWS около 3,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение доли HMWS около 2,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С

Низкомолекулярные соединения (LMWS) — В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение доли LMWS около 5,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение доли LMWS около 2,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение доли LMWS около 1,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00175] Капиллярное изoeлектрическое фокусирование (КИЭФ)

[00176] КИЭФ, материалы и способы — Аналитическую процедуру проводят на коммерчески доступном анализаторе КИЭФ с визуализацией, оснащенном автоматическим пробоотборником. Для анализа используют капилляр размером 100 мкм с покрытием на кварцевой внутренней стенке и полиимидным покрытием на наружной стенке. Дополнительно используют раствор анодного электролита из разбавленной фосфорной кислоты и метилцеллюлозы, раствор катодного

электролита из гидроксида натрия и метилцеллюлозы и определенный тип и количество амфолитов. Тестируемые изделия обрабатывают карбоксипептидазой В (СРВ) для удаления С-концевого лизина и устранения вариabельностей, возникающих из-за наличия нескольких С-концевых вариантов для каждой заряженной молекулы. Автоматический пробоотборник прибора установлен на 4 °С как для предварительной фокусировки, так и для фокусировки. Напряжение и время предварительной фокусировки составляют 1500 В и 1 минуту соответственно. Напряжение и время фокусировки составляют 3000 В и 7 минут соответственно.

[00177] Результаты КИЭФ отражают стабильность

[00178] *Главный пик* — В одном варианте осуществления стабильность определяется по величине главного пика 37–87% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется по величине главного пика 47–87% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется по величине главного пика 46–87% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется по величине главного пика 57–87% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется по величине главного пика 66–83% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00179] *Сумма кислотных пиков* — В одном варианте осуществления стабильность определяется как величина общей суммы кислотных пиков,

стабильность определяется как величина общей суммы щелочных пиков, составляющая около 10,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как величина общей суммы щелочных пиков, составляющая около 10,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как величина общей суммы щелочных пиков, составляющая около 8,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как величина общей суммы щелочных пиков, составляющая около 8,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как величина общей суммы щелочных пиков, составляющая около 5,0% или менее после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00181] Аналитические тесты — количество

[00182] Определение концентрации белка по величине A280

[00183] Концентрацию белка в лекарственном препарате устанавливают посредством количественного определения поглощения при 280 нм (A280).

[00184] Определение концентрации белка по величине A280, материалы и способы

[00185] Измерение концентрации белка проводят с применением квалифицированного и откалиброванного двухлучевого спектрофотометра UV-Vis. Тестируемые изделия разводят в соотношении 1 : 125 с использованием 0,9%

(масс./об.) NaCl. Для измерения образцов используют кварцевые полумикрокюветы (1,4 мл) с длиной оптического пути 1 см и черными или матовыми боковыми стенками. Спектрофотометр настроен на длину волны 280 нм, ширину щели 1 нм и отклик в одну (1) секунду. В качестве холостого контроля используют 0,9%

(масс./об.) NaCl. Концентрацию белка (мг/мл) рассчитывают делением произведения значений поглощения тестируемого изделия и коэффициента разбавления на значение произведения константы поглощения антитела и длины оптического пути прибора (например, без ограничений, константы поглощения аминамитаба $1,40 \text{ (мг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и длины оптического пути прибора 1 см).

[00186] Результаты измерения концентрации белка отражают стабильность

[00187] В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации белка от 40 до 60 мг/мл после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации белка от 45 до 55 мг/мл после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации белка от 43 до 57 мг/мл после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации белка от 47 мг/мл до 54 мг/мл после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации белка от 45 мг/мл до 55 мг/мл после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.

[00188] Аналитические тесты — эффективность

[00189] Эффективность (связывание с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR))

[00190] Связывание лекарственного препарата с EGFR в условиях *in vitro* показано с помощью формата гомогенного конкурентного анализа резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET). В рамках этой процедуры различные концентрации образца немеченого биспецифического антитела к EGFR-cMet конкурируют с биспецифическим антителом к EGFR-cMet, меченым донорным флуорофором (хелатом европия (Eu)), за связывание с антигеном EGFR, меченым акцепторным флуорофором (Cy5). Возбуждение донорного флуорофора приводит к передаче энергии связанному акцепторному флуорофору (процесс FRET). Возникающий в результате процесс FRET обнаруживают по испусканию света при 665 нм с помощью микропланшетного ридера, способного измерять флуоресценцию с временным разрешением. Кривые дозозависимого ответа образцов сравнивают с кривой эталонного материала (RM).

[00191] Связывание с EGFR, материалы и способы. Сертифицированный коммерческий EGFR, рекомбинантный человеческий EGFR/ErbB1/HER1 с C-концевой гистидиновой (His) меткой, вводят в реакцию с сертифицированным коммерческим Cy5 Mono NHS Ester для получения EGFR, меченого Cy5.

Валидированное биспецифическое антитело к EGFR-cMet вводят в реакцию с сертифицированным коммерческим хелатом европия (Eu) для получения биспецифического антитела к EGFR-cMet, меченого Eu. Последовательные разведения эталонного материала (RM) биспецифического антитела к EGFR-cMet, контроля анализа и тестируемых изделий тестируют параллельно на одном и том же аналитическом планшете. Биспецифическое антитело к EGFR-cMet, меченое Eu, добавляют к каждому RM, контролю анализа и тестируемому изделию с последующим осторожным встряхиванием аналитического планшета. Затем аналогичным образом добавляют Cy5-EGFR, снова осторожно встряхивают аналитический планшет и инкубируют в темноте в течение 4 ± 1 часов. Далее флуоресценцию измеряют посредством спектрофотометрии при 665 нм, строят график зависимости от концентрации антител и анализируют с помощью четырехпараметрической логистической модели. Для RM, контроля анализа и образцов определяют концентрацию антител, необходимую для получения половины максимальной реакции флуоресценции (EC50). Значения эффективности

для контроля анализа и образцов рассчитывают на основе соотношения значений EC50 образца (или контроля) и RM и представляют в процентах относительно активности RM.

[00192] Результаты измерения активности связывания с EGFR отражают

- 5 стабильность В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания 50%–150% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.
- 10 В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания 60%–140% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.
- 15 В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания 60%–140% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.
- 20 В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания 65%–130% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.
- 25 В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания, находящееся в диапазоне от около 80% до 120% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение
- 30 около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания, находящееся в диапазоне от около 70% до 130% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при

температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00193] Эффективность (связывание cMet)

[00194] Связывание биспецифического антитела к EGFR-cMet с c-MET в условиях *in vitro* показано с помощью формата гомогенного конкурентного анализа резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET). В рамках этой процедуры различные концентрации образца немеченого биспецифического антитела к EGFR-cMet конкурируют с биспецифическим антителом к EGFR-cMet, меченым донорным флуорофором (хелатом европия (Eu)), за связывание с антигеном c-MET, меченым акцепторным флуорофором (Cy5). Возбуждение донорного флуорофора приводит к передаче энергии связанному акцепторному флуорофору (процесс FRET). Возникающий в результате процесс FRET обнаруживают по испусканию света при 665 нм с помощью микропланшетного ридера, способного измерять флуоресценцию с временным разрешением. Кривые дозозависимого ответа образцов сравнивают с кривой эталонного материала (RM).

[00195] Связывание с c-MET, материалы и способы. Сертифицированный коммерческий cMet, рекомбинантный cMet/HGFR с c-концевой HIS-меткой меткой, вводят в реакцию с сертифицированным коммерческим Cy5 Mono NHS Ester для получения c-MET, меченого Cy5. Валидированное биспецифическое антитело к EGFR-cMet вводят в реакцию с сертифицированным коммерческим хелатом европия (Eu) для получения биспецифического антитела к EGFR-cMet, меченого Eu. Последовательные разведения RM биспецифического антитела к EGFR-cMet, контроля анализа и тестируемых изделий тестируют параллельно на одном и том же аналитическом планшете. Биспецифическое антитело к EGFR-cMet, меченое Eu, добавляют к каждому RM, контролю анализа и тестируемому изделию с последующим осторожным встряхиванием аналитического планшета. Затем аналогичным образом добавляют Cy5-c-MET, снова осторожно встряхивают планшет и инкубируют в темноте в течение 4 ± 1 часов. Далее флуоресценцию измеряют посредством спектрофотометрии при 665 нм, строят график зависимости от концентрации антител и анализируют с помощью четырехпараметрической логистической модели. Для RM, контроля анализа и образцов определяют концентрацию антител, необходимую для получения половины максимальной реакции флуоресценции (EC50). Значения эффективности для контроля анализа и

образцов рассчитывают на основе соотношения значений EC50 образца (или контроля) и RM и представляют в процентах относительно активности RM.

[00196] Результаты измерения активности связывания с cMet отражают

стабильность. В одном варианте осуществления стабильность определяется как

значение активности связывания, находящееся в диапазоне от около 50% до около 150% относительно эталонного материала после хранения в течение около

12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В одном варианте

осуществления стабильность определяется как значение активности связывания, находящееся в диапазоне от около 60% до около 140% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при

температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания, находящееся в диапазоне от около 60% до 140% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в

течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания, находящееся в диапазоне от около 65% до 125% относительно

эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания, находящееся в

диапазоне от около 80% до около 120% относительно эталонного материала после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °C, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °C.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение активности связывания, находящееся в диапазоне от около 75% до около 125% относительно эталонного материала после хранения в течение около

12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00197] Аналитические тесты — поверхностно-активное вещество

[00198] Количественное определение концентрации полисорбата-80

[00199] Концентрацию полисорбата 80 количественно определяют посредством ионообменной/гидрофобной ВЭЖХ в смешанном режиме.

[00200] PS 80, материалы и способы. Анализ проводят с помощью прибора для градиентной ВЭЖХ, оснащенного встроенной колонкой 2,1 × 20 мм, содержащей смачиваемые водой полимерные сферические частицы сорбента для смешанного режима диаметром 30 мкм, испарительным детектором светорассеяния (ELSD) и отсеком колонки с регулируемой температурой, установленной на 30 °С. Скорость потока установлена на 1 мл/минуту, а температура испарителя ELSD установлена на 50 °С. Подвижная фаза А представляет собой 2% (об./об.) муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В представляет собой 2% (об./об.) муравьиной кислоты в изопропиловом спирте. Для создания калибровочных и эталонных стандартов используют чистый полисорбат 80. Образцы тестируемых изделий вводят в чистом виде.

[00201] Результаты измерения концентрации полисорбата 80 отражают стабильность. В одном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации PS80 0,03–0,08% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В другом варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации PS80 0,02–0,09% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации PS 80 0,04–0,08% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации PS 80 0,03–

0,08% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С. В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации PS 80 0,05–0,08% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления стабильность определяется как значение концентрации PS 80 0,04–0,08% после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5 °С, после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25 °С и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5 °С.

[00202] Аналитические тесты — описание процедур

[00203] Пептидная карта

[00204] Цель этого теста — измерить уровни посттрансляционных модификаций, таких как окисление, дезамидирование и изомеризация, которые могут присутствовать в структуре антитела. Тестируемые изделия подвергают ферментативному расщеплению для получения пептидных сегментов. Затем эти пептиды оценивают посредством сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС). Каждую анализируемую пептидную последовательность идентифицируют относительно ее известного положения в общей структуре антитела. Посттрансляционные модификации определяют путем сравнения измеренной массы идентифицированной пептидной последовательности с ее ожидаемой массой.

[00205] Пептидное картирование, материалы и способы. Образцы денатурируют 6 М гуанидином, 50 мМ Трис с pH 8,0, 5 мМ EDTA и фильтруют с помощью центрифужного фильтра с концентратором 30 кДа (фильтрат отбрасывают). Денатурированные образцы восстанавливают 1 М дитиотреитола (ДТТ) с последующим алкилированием 1 М иодоацетата натрия и дополнительно обрабатывают ДТТ для остановки реакции. Реакционную смесь подвергают обмену в буфере для расщепления (50 мМ Трис с pH 7,0, с 1 мМ CaCl₂) на колонках Sephadex G-25, используя отдельные колонки для холостых проб, эталонного материала и тестируемых изделий. Аликвоту маточного раствора трипсина 1 мг/мл

добавляют к образцу в буфер для расщепления, что обеспечивает концентрацию трипсина 20 мкл/мл. Раствор инкубируют при 37 °С в течение 2 часов ± 30 минут. Обработанному трипсином раствору позволяют остыть до комнатной температуры и инактивируют фермент трифторуксусной кислотой. Обработанные образцы

5 оценивают с помощью прибора для сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС), оснащенного колонкой Waters Acquity BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C18, 2,1 x 100 мм, 1,7 мкм, 130 Å, и присоединенным автоматическим пробоотборником. Подвижная фаза А представляет собой 0,1% муравьиной кислоты (FA) в воде. Подвижная фаза В

10 представляет собой 0,1% FA в ацетонитриле (подвижная фаза В). Автоматический пробоотборник установлен на 2–8 °С, колонка установлена на 40 °С, а скорость потока установлена на 500 мкл/минуту. Элюированные пептиды подвергали ионизации электрораспылением, а их детекцию осуществляли с помощью калиброванного прибора для онлайн-масс-спектрометрии.

15 **[00206] Пример 1. Многофакторные скрининговые исследования с высокой пропускной способностью (НТР)**

[00207] Многофакторные скрининговые исследования с высокой пропускной способностью (НТР) проводили для выбора комбинаций буфера, эксципиента, полисорбата и pH состава. Этого достигают путем создания множества тестируемых

20 составов, имеющих различные комбинации буферов, эксципиентов, полисорбатов и значений pH. Затем тестируемые составы подвергают искусственному стрессу и анализируют на наличие суррогатных маркеров дестабилизации белка.

[00208] В ходе этих исследований приблизительно 200 мкл каждого тестируемого состава выдерживали при 65 °С в течение 24 часов и затем позволяли

25 пассивно восстановиться до комнатной температуры окружающей среды. Далее образцы, доведенные до равновесного состояния по температуре, подвергали спектрофотометрическому анализу для определения поглощения тестируемых составов при 350 нм. Увеличение поглощения при 350 нм представляет собой общепризнанный суррогатный коррелятивный признак дестабилизации и агрегации

30 белка. Таким образом, после теплового стресса тестируемые составы с относительно низкими значениями поглощения считаются «стабильными» составами, причем увеличение измеренных значений поглощения коррелирует с относительным снижением стабильности. Композиция из тестируемых составов и их измеренные значения поглощения при 350 нм показаны в таблице 1 ниже. Концентрация буфера

для всех тестируемых составов составляла 20 мМ. Для контекста: типичное значение поглощения пустой лунки (холостой пробы) при 350 нм составляет 0,104 единицы поглощения (AU).

5 Таблица 1. Композиция из тестируемых составов и их измеренное поглощение при 350 нм

Буфер	pH	Поверхностно-активное вещество	Экципиент	Единицы поглощения при 350 нм
Фосфат	7,0	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	1,286
			5% сорбита	1,331
			8% трегалозы	1,324
		0,04% (масс./об.) полисорбата 80	8% сахарозы	1,352
			5% сорбита	1,383
			8% трегалозы	1,357
Гистидин	6,5	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	0,222
			5% сорбита	0,260
			8% трегалозы	0,245
		0,04% (масс./об.) полисорбата 80	8% сахарозы	0,234
			5% сорбита	0,278
			8% трегалозы	0,280
	6	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	0,165
			5% сорбита	0,180
			8% трегалозы	0,181
		0,04% (масс./об.) полисорбата 80	8% сахарозы	0,168
			5% сорбита	0,195
			8% трегалозы	0,178
Ацетат	5,5	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	0,135
			5% сорбита	0,138
			8% трегалозы	0,137
		0,04% (масс./об.) полисорбата 80	8% сахарозы	0,131
			5% сорбита	0,131
			8% трегалозы	0,131
	5,5	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	0,179
			5% сорбита	0,188
			8% трегалозы	0,201
		0,04% (масс./об.) полисорбата 80	8% сахарозы	0,195
			5% сорбита	0,207
			8% трегалозы	0,208
	5	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	0,141
			5% сорбита	0,146
			8% трегалозы	0,138
		0,04% (масс./об.) полисорбата 80	8% сахарозы	0,145
			5% сорбита	0,149
			8% трегалозы	0,133
Цитрат	4,5	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	0,143
			5% сорбита	0,150
			8% трегалозы	0,143
		0,04% (масс./об.) полисорбата 80	8% сахарозы	0,151
			5% сорбита	0,160
			8% трегалозы	0,130
	4,5	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% сахарозы	0,515
			5% сорбита	0,596
Цитрат	4,5	0,04% (масс./об.) полисорбата 20	8% трегалозы	0,632
			8% сахарозы	0,673

полисорбата 80

5% сорбита
8% трегалозы0,779
0,838

[00209] Результаты измерения поглощения в значительной степени зависели от рН нелинейным образом: самые низкие значения поглощения отмечались при рН 5,5, а самые высокие значения отмечались при рН 4,5 и 7,0. Однако химические свойства буфера также, по-видимому, играли роль. При том же рН 5,5 гистидин демонстрировал более низкие значения, чем ацетат. С учетом рКа ацетата (4,76) и гистидина (6,04) гистидин будет иметь более высокую буферную емкость, чем ацетат при рН 5,5. Более высокая емкость объясняет более низкие значения поглощения для гистидина по сравнению с ацетатом при одинаковом значении рН. Это также может объяснить разницу в результатах между цитратом (рКа 3,09) и ацетатом (4,76) при рН 4,5. И наоборот, фосфат (рКа 6,82) должен был обладать высокой буферной емкостью при рН 7,0. Однако значения поглощения фосфата были в пять-десять раз выше, чем большинство значений, отмечавшихся в ходе исследования, и поэтому он может быть категорически исключен в качестве потенциальной буферной системы. Аналогичным образом значения поглощения цитрата при рН 4,5 были в два-пять раз выше, чем большинство значений, отмечавшихся в ходе исследования. Создание состава с цитратом, близкого к цитрату по рКа, потребует значений рН, непрактичных для фармацевтических областей применения, и поэтому он также может быть категорически исключен в качестве потенциальной буферной системы.

[00210] Последовательное, хотя и слабое влияние молекул эксципиентов на значения поглощения отмечалось при изучении результатов исследования как двух групп молекул полисорбатов внутри восьми групп комбинаций буфера / значения рН, что дало 16 исследуемых групп. С этой точки зрения сахара продемонстрировала самое низкое значение поглощения по сравнению с сорбитом и трегалозой в 13 из 16 групп. Таким образом, хотя сорбит и трегалоза могут оказаться приемлемыми эксципиентами, сахара может считаться предпочтительным эксципиентом.

[00211] На протяжении всего исследования полисорбат 20 по существу демонстрировал более низкие значения поглощения по сравнению с соответствующим значением полисорбата 80. Для контекста: основная роль поверхностно-активных веществ в составах моноклональных антител, таких как полисорбаты, заключается в защите антитела от механического стресса

(встряхиванием) в отличие от теплового стресса, применявшегося в ходе данного скринингового исследования НТР. С этой точки зрения различия в значениях поглощения, отмечавшиеся между двумя видами полисорбатов, можно считать незначительными. Однако следует отметить, что самые низкие значения поглощения, наблюдавшиеся в ходе данного исследования, имел полисорбат 80.

[00212] Пример 2. Диапазон концентраций полисорбата, исследование со встряхиванием и замораживанием-оттаиванием

[00213] Данное исследование проводили для определения диапазона концентраций полисорбата 80, который придает амивантамабу устойчивость к механическому, межфазному стрессу и стрессу замораживанием/оттаиванием. В ходе исследования также оценивали защитные свойства полисорбата 80 после хранения в течение 12 месяцев при температуре 5 °С.

[00214] Было создано шесть идентичных наборов флаконов с тестируемым составом. Каждый набор содержал по одному флакону каждого из тестируемых составов с низкой (0,03%), целевой (0,06%) и высокой (0,08%) концентрациями полисорбата 80 (% масс./об.). Все остальные компоненты состава оставались неизменными (50 мг/мл амивантамаба, 10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 1 мг/мл метионина, 20 мкг/мл этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) при pH 5,7). Составы дозировали в номинальном объеме 7,5 мл во флаконы 8R, закупоривали, накрывали крышкой и герметизировали путем обжатия.

[00215] Для определения общих исходных данных исследования один набор флаконов тестировали в начале исследования в качестве необработанного, нулевого по времени контроля ($T = 0$).

[00216] Для оценки стабилизирующего эффекта полисорбата 80 против механического и межфазного стресса один набор флаконов помещали горизонтально на орбитальный шейкер и встряхивали при 250 об/мин до 72 часов при комнатной температуре окружающей среды и в условиях освещенности (встряхивание T72h). В течение того же 72-часового периода второй соответствующий контрольный набор флаконов, не подвергавшихся встряхиванию, держали вертикально при комнатной температуре окружающей среды и в условиях освещенности (контроль T72h).

[00217] Чтобы оценить стабилизирующий эффект состаренного полисорбата 80 против механического и межфазного стресса, два набора флаконов выдерживали в течение 12 месяцев при 5 °С. Применяя способы, изложенные выше,

один набор встряхивали в течение 72 часов (встряхивание T12m T72h), другой набор выдерживали в качестве контроля (контроль T12m T72h).

[00218] Для оценки стабилизирующего эффекта полисорбата 80 против стресса от замораживания/оттаивания один набор флаконов подвергали пяти (5) циклам замораживания/оттаивания (5xFT), причем один цикл определяли как замораживание до -70 °С с последующим пассивным оттаиванием при комнатной температуре окружающей среды.

[00219] Как показано в приведенных ниже результатах, существенных различий в значениях характеристик после стресса встряхиванием по сравнению с T = 0 и контрольными образцами, не подвергавшимися встряхиванию, не отмечалось. Аналогичные результаты отмечались для образцов, выдержанных в течение 12 месяцев при температуре 5 °С перед стрессом встряхиванием. Также не отмечалось существенных различий в значениях характеристик после стресса от замораживания/оттаивания по сравнению с контролями T = 0. При стрессе как встряхиванием, так и замораживанием/оттаиванием не было существенных различий в значениях характеристик между образцами с низким, целевым и высоким содержанием полисорбата 80. Это указывает на то, что стабильный амивантамаб в смеси с полисорбатом 80 в диапазоне от 0,03% (масс./об.) до 0,08% (масс./об.) может защитить от механического, межфазного стресса и стресса от замораживания/оттаивания.

[00220] Таблица 2. Результаты исследования со встряхиванием и замораживанием-оттаиванием

Таблица 2. Результаты исследования со встряхиванием и замораживанием-оттаиванием

Условие тестирования	Тестируемый состав (% (масс./об.) PS 80)	Краситель	pH	Мутность		Твердые частицы (невидимые)		A280	эВЭЖХ		
				NTU		≥ 10 мкм частиц/флакон	≥ 25 мкм частиц/флакон		Основной компонент, %	HMWS, %	LMW S, %
T = 0	0,03	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,8	4,2		88	30	50,0	98,8	1,1	0,0
	0,06	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,8	4,5		37	13	50,2	98,8	1,1	0,0
	0,08	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,8	4,6		38	10	50,1	98,8	1,1	0,1
Встряхивание T72h	0,03	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,8	4,5		125	12	50,3	98,8	1,1	0,1
	0,06	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,8	4,8		70	8	50,9	98,9	1,1	0,1
	0,08	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,7	4,6		87	23	50,4	98,8	1,1	0,1
Контроль T72h	0,03	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,8	4,4		57	20	50,1	98,8	1,1	0,1
	0,06	≤ B9, ≤ BY7, ≤ Y7	5,8	4,3		42	3	50,0	98,8	1,1	0,1

	0,08	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,8	4,5	55	17	50,0	98,8	1,1	0,1
Встряхивание T12m T72h	0,03	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,9	4,7	167	23	49,9	98,6	1,2	0,2
	0,06	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,9	4,7	65	0	50,3	98,7	1,2	0,2
	0,08	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,8	4,6	80	18	50,5	98,6	1,2	0,2
	0,03	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,8	4,5	95	12	50,3	98,7	1,2	0,2
Контроль T12m T72h	0,06	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,8	6,4	30	3	50,3	98,7	1,2	0,2
	0,08	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,8	6,5	35	5	50,2	98,6	1,2	0,2
	0,06	$\leq B9, \leq BY7, \leq Y7$	5,8	4,7	112	7	50,4	98,8	1,1	0,0

Таблица 3. Результаты исследования со встряхиванием и замораживанием-оттаиванием

Условие тестирования	Тестируемый состав (%) (масс./об.) PS 80)	cSDS-электрофорез (в восстанавливающих условиях)			cSDS-электрофорез (в невосстанавливающих условиях)			КИЭФ		PS80 (%)	EGFR Связывание, %	сMET Связывание, %
		Чистота, %	AGH C, %	Отсутствие нового пика > 1,0%	Чистота, %	Отсутствие нового пика > 1,0%	Главный пик, %	Сумма кислотных пиков, %	Сумма щелочных пиков, %			
T0	0,03	95,4	3,9	NNP	98,4	NNP	74,4	23,4	2,3	0,027	106	93
	0,06	95,4	3,9	NNP	98,4	NNP	74,7	22,3	2,9	0,055	102	94
	0,08	95,4	3,9	NNP	98,3	NNP	75,3	22,3	2,4	0,076	109	100
Встряхивание T72h	0,03	95,1	4,0	NNP	98,5	NNP	74,1	23,3	2,7	0,027	94	104
	0,06	95,3	3,9	NNP	98,5	NNP	73,5	23,7	2,9	0,053	110	99
	0,08	95,3	3,9	NNP	98,5	NNP	73,6	23,4	2,9	0,074	104	98
Контроль T72h	0,03	95,3	3,9	NNP	98,5	NNP	73,9	23,3	2,9	0,027	93	99
	0,06	95,3	3,9	NNP	98,5	NNP	73,3	23,8	2,9	0,052	104	100
	0,08	95,3	3,9	NNP	98,5	NNP	74,7	22,9	2,5	0,074	107	99
Встряхивание T12m T72h	0,03	95,2	4,0	NNP	98,0	NNP	74,2	23,0	2,9	0,031	92	102
	0,06	95,2	4,0	NNP	97,9	NNP	74,5	22,6	3,0	0,051	98	96
	0,08	95,2	4,0	NNP	98,0	NNP	74,4	22,9	2,6	0,076	90	83
Контроль T12m T72h	0,03	95,2	4,0	NNP	98,1	NNP	74,1	22,8	3,2	0,031	88	103
	0,06	95,2	4,0	NNP	98,0	NNP	74,1	22,8	3,1	0,051	102	98
	0,08	95,2	4,0	NNP	98,1	NNP	74,5	22,7	2,9	0,078	103	81
5xFT	0,06	95,2	4,0	NNP	98,5	NNP	74,5	22,7	2,9	0,054	101	104

[00221] Пример 3. Исследование с добавлением металлов

5 **[00222]** Данное исследование проводили для оценки влияния ионов металлов и перекисей, потенциально присутствующих или вводимых в рамках процессов получения биспецифического антитела к EGFR-cMet. Его разработали, чтобы оценить стабильность состава под воздействием совокупности условий чрезмерного

стресса и эффективность дополнительных эксципиентов состава в отношении снижения или предотвращения окислительных процессов.

[00223] Тестируемые составы состояли из 50 мг/мл амивантамаба, 10 мМ гистидина, 8,5% (масс./об.) сахарозы, 0,06% (масс./об.) PS80 с добавлением или без добавления 1 мг/мл L-метионина и 20 мкг/мл EDTA и имели pH 5,7. Условие чрезмерного стресса создавали путем добавления в тестируемые составы окисляющих металлов (например, окисляющих металлов, включая, без ограничений, железо (Fe³⁺), хром (Cr³⁺), медь (Cu²⁺), никель (Ni²⁺) и молибден (Mo⁵⁺)) и/или растворенной перекиси водорода. Выбор металлов основан на составе компонентов металлических сплавов, потенциально присутствующих в рамках процессов получения. Перекись водорода выбрана из-за потенциального наличия остаточного материала после ее использования для деконтаминации асептических производственных помещений. Оцениваемые концентрации металлов и перекиси водорода вдвое превышают самые высокие значения, которые могут быть отмечены в рамках коммерческих процессов получения лекарственных препаратов по стандартам GMP. Сводная информация о тестируемых составах приведена в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Композиция из тестируемых составов и стрессирующих факторов

ID № состава	Описание	Композиция из тестируемого состава	Добавление металла	Добавление перекиси водорода
I	Отсутствие добавок (отрицательный контроль)	10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 0,06% PS80	Нет	Нет
II	Отсутствие добавок + металл	10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 0,06% PS80	Да	Нет
III	Отсутствие добавок + перекись	10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 0,06% PS80	Нет	Да
IV	EDTA/ + метионин (положительный контроль)	10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 0,06% PS80, 20 мкг/мл EDTA, 1 мг/мл метионина	Нет	Нет
V	EDTA + метионин + металл + перекись	10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 0,06% PS80, 20 мкг/мл EDTA, 1 мг/мл метионина	Да	Да

[00224] Тестируемые составы аликвотировали во флаконы 8R с номинальным объемом 7,5 мл. Флаконы закупоривали, накрывали крышкой и герметизировали путем обжатия. Флаконы помещали для испытания стабильности при рекомендуемых (5 °C), форсированных (25 °C) и стрессовых (40 °C) условиях

хранения. В определенные моменты времени образцы извлекали и анализировали на предмет окисления посредством пептидного картирования.

[00225] Результаты исследования

5 [00226] При рекомендуемых условиях хранения в течение шести месяцев (5 °C) составы без добавок, подвергавшиеся воздействию металлов (II) или перекиси водорода (III), демонстрировали незначительное или слабое усиление окисления по сравнению с составами без добавок (I). Это указывает на то, что повышенные уровни металлов и перекиси, по-видимому, вызывают незначительное или слабое окисление в составах без добавок (I) при рекомендуемых условиях хранения. Однако при тех же условиях испытания стабильности, 5 °C на протяжении шести месяцев, не наблюдалось значимой разницы в показателях окисления между составами с добавлением метионина/EDTA (IV) и таким же составом с добавками, подвергавшимся воздействию металлов и перекиси водорода (V). Кроме того, состав с добавками (IV) демонстрировал более низкие показатели окисления, чем составы без добавок, подвергавшиеся воздействию металлов (II) или перекиси водорода (III). Это указывает на то, что составы, дополненные EDTA и метионином, способны ослаблять окисление, вызываемое повышенными уровнями металлов и перекиси при рекомендуемых условиях хранения.

20 [00227] Те же тенденции отмечались при стрессовых (40 °C) условиях хранения в течение одного месяца и при форсированных (25 °C) условиях в течение шести месяцев, но на более выраженном уровне. Составы без добавок, подвергавшиеся воздействию металлов (II) или перекиси водорода (III), явно демонстрировали повышенную степень окисления по сравнению с составами без добавок (I). Однако значимой разницы в показателях окисления между составами с добавлением метионина/EDTA (IV) и таким же составом с добавками, подвергавшимся воздействию металлов и перекиси водорода (V), не наблюдалось. Кроме того, состав с добавками (IV) явно демонстрировал более низкие показатели окисления, чем составы без добавок, подвергавшиеся воздействию металлов (II) или перекиси водорода (III). Это показывает устойчивую способность составов с добавлением EDTA и метионина ослаблять окисление, вызываемое повышенными уровнями металлов и перекиси при форсированных и стрессовых условиях хранения.

[00228] В целом эти данные демонстрируют, что составы, дополненные метионином и EDTA, успешно обеспечивают устойчивое снижение окисления, опосредованного металлами и перекисью.

[00229] Пример 4. Повышение устойчивости состава

[00230] Дизайн исследования

[00231] Данное исследование проводили, чтобы изучить влияние многофакторного варьирования концентраций компонентов состава лекарственного препарата с биспецифическим антителом к EGFR-cMet, выдерживаемого в рекомендуемых (5 °C) и форсированных (25 °C) условиях. К компонентам состава, подвергавшимся оценке, относились концентрация белка, концентрация гистидина, концентрация сахарозы, концентрация полисорбата 80, концентрация EDTA/метионина и pH. Диапазоны концентраций тестируемых факторов приведены в таблице 5.

Таблица 5. Диапазоны концентраций тестируемых факторов

Тестируемые факторы	Низкий уровень	Целевой уровень	Высокий уровень
Биспецифическое антитело к EGFR-cMet (амивантамаб), концентрация белка (мг/мл)	44	50	56
pH	5,2	5,7	6,2
Концентрация гистидина (мМ)	8	10	12
Концентрация сахарозы (% масс./об.)	6,8	8,5	10,2
Концентрация EDTA (мкг/мл)	16	20	24
Концентрация метионина (мг/мл)	0,8	1	1,2
Концентрация PS80 (% масс./об.)	0,036	0,06	0,084

[00232] На основании этого критерия использовали статистическое программное обеспечение JMP®, чтобы создать план дробного факторного эксперимента с центральными точками (таблица 6).

Таблица 6. Композиция из тестируемых составов

Тестируемый состав	Белок (мг/мл)	pH	Гистидин (мМ)	Сахароза (% масс./об.)	EDTA (мкг/мл)	Метионин (мг/мл)	PS80 (% масс./об.)
1	44	5,2	8	6,8	16	0,8	0,036
2	44	6,2	8	10,2	24	1,2	0,036
3	50	5,7	10	8,5	20	1	0,06
4	44	6,2	12	10,2	16	0,8	0,036

5	56	6,2	8	10,2	16	0,8	0,084
6	50	5,7	10	8,5	20	1	0,06
7	56	5,2	12	6,8	24	1,2	0,084
8	56	6,2	12	6,8	24	1,2	0,036
9	56	5,2	8	10,2	16	0,8	0,036
10	44	5,2	12	10,2	24	1,2	0,084
11	44	6,2	8	6,8	16	0,8	0,084

[00233] Тестируемые составы получали и аликвотировали во флаконы 8R с номинальным объемом 7,5 мл. Флаконы закупоривали, накрывали крышкой и герметизировали путем обжата. Флаконы помещали для испытания стабильности при рекомендуемых (5 °C) и форсированных (25 °C) условиях. В определенные моменты времени образцы извлекали и анализировали.

[00234] Результаты исследования

[00235] Результаты тестирования по каждой характеристике одиннадцати составов в начале исследования (нулевая точка), через 12 месяцев при рекомендуемых условиях хранения (5 °C) и через 6 месяцев при повышенной температуре (25 °C) показаны в таблице 7. Данные представлены в виде диапазона, среднего значения и стандартного отклонения (CO) для одиннадцати составов по каждой характеристике.

[00236] Результаты анализа для всех составов, выдержанных в течение 12 месяцев при 5 °C, отражают небольшие изменения в значениях аналитических тестов, что указывает на стабильность. Способность всех составов с многовариантными диапазонами концентраций эксципиентов давать узкий диапазон значений результатов анализа тестирования свидетельствует об устойчивости составов в пределах тестируемых границ и условий хранения. Кроме того, весь диапазон значений, наблюдавшихся для каждого анализа в рамках данного исследования, соответствовал наиболее предпочтительному варианту осуществления стабильности при выдерживании при 2–8 °C.

[00237] Результаты анализа для всех составов, выдержанных в течение шести месяцев при форсированных (25 °C) условиях хранения, демонстрировали эффекты деградации, соответствующие профилю стабильности биспецифического антитела к EGFR-cMet, подвергшегося длительному воздействию форсированных условий хранения. Однако для большинства результатов величина эффекта была относительно незначительной по сравнению с результатами, отмечавшимися после

12 месяцев при 5 °С. Аналогичным образом величина увеличения диапазона значений результатов была также относительно незначительной: немногим менее половины диапазонов были эквивалентны или меньше тех, которые отмечались после 12 месяцев при 5 °С. Это показывает, что даже при форсированных условиях хранения многовариантные диапазоны концентраций эксципиентов дают относительно непротиворечивые результаты.

Таблица 7А. Данные о стабильности для составов биспецифических антител к EGFR-cMet, выдержанных при 25 °С в течение 6 месяцев и 5 °С в течение 12 месяцев (диапазон, среднее значение и стандартное отклонение)

Анализ		Время и условия хранения								
		Т = 0 мес.			6 мес., 25 °С			12 мес., 5 °С		
		Диапазон	Среднее	СО	Диапазон	Среднее	СО	Диапазон	Среднее	СО
КИЭФ	% площади главного пика	73,9–75,2	74,5	0,4	55,1–58,2	56,3	1,1	72,5–74,7	73,8	0,7
	% суммы кислотных пиков	22–23,4	22,7	0,4	37,8–40,4	39,1	0,8	22,8–24,9	23,7	0,8
	% суммы щелочных пиков	2,4–3,4	2,8	0,2	3,9–5,5	4,7	0,5	2,1–3,0	2,5	0,3
сSDS-электрофорез	% чистоты (невосстанавливающие условия)	97,6–98,4	98,1	0,3	95,7–96,5	96,1	0,3	97,8–98,2	98,1	0,1
	% чистоты (восстанавливающие условия)	95–95,1	95,1	0,1	93–98,3	93,2	0,1	94,8–95,1	95,0	0,1
эВЭЖХ	Агрегат, %	0,8–1,0	0,9	0,1	0,8–1,4	1,1	0,2	0,81–1,4	1,1	0,2
	Мономер, %	98,9–91,1	99,0	0,1	98–98,6	98,3	0,2	98,5–99	98,8	0,2
	Фрагменты, %	0,1–0,1	0,1	0,0	0,5–0,7	0,6	0,1	0,14–0,16	0,2	0,0
Твердые частицы (невидимые) ^а	Частиц/контейнер ≥ 10 мкм	25–215	69,9	59,2	27–97	64,9	19,5	13–165	68,0	41,5
	Частиц/контейнер ≥ 25 мкм	5–44	15,5	11,3	5–8	11,7	4,6	0–25	10,6	8,3
Мутность	NTU	3,5–5,1	4,1	0,5	3,6–5,1	4,4	0,5	3,5–4,9	4,1	0,5

^а Высокое стандартное отклонение, наиболее вероятно, связано с вариабельностью анализа при таких низких уровнях содержания твердых частиц

[00238] Пример 5. Производство нерасфасованного лекарственного препарата

[00239] Описание процесса

[00240] Растворы для обработки

5

Таблица 7В. Растворы для обработки, целевая композиция и диапазоны

Раствор	Композиция и диапазоны
Буфер для диафильтрации	10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 1 мг/мл L-метионина, pH 5,6 ± 0,3
Полисорбат 80, маточный раствор EDTA	10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 1 мг/мл L-метионина, 6,0% (масс./об.), полисорбата 80, 2 мг/мл EDTA, pH 5,6 ± 0,3

[00241] Ультрафильтрация/диафильтрация (UF/DF)

[00242] Ультрафильтрацию/диафильтрацию (UF/DF) проводят для преобразования промежуточного производственного раствора удерживающего вирусы фильтрата амивантамаба в раствор предварительно подготовленного нерасфасованного препарата (pFB), состоящий из 50 мг/мл амивантамаба, 10 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 1 мг/мл L-метионина, с pH 5,7.

10

[00243] Приготовление нерасфасованного препарата (FB) амивантамаба

[00244] Маточный раствор полисорбата 80 (6,0% масс./об.) и EDTA (2 мг/мл) добавляют в pFB при разведении 1 : 100 для получения конечной концентрации 0,06% (масс./об.) полисорбата 80 и 20 мкг/мл EDTA, что дает нерасфасованный препарат (FB), состоящий из 50 мг/мл амивантамаба в 10 мМ гистидина, 8,5% (масс./об.) сахарозы, 1 мг/мл L-метионина, 0,06% полисорбата 80, 20 мкг/мл EDTA, с pH 5,7. Затем раствор FB равномерно перемешивают. Конечную фильтрацию нерасфасованного препарата осуществляют с помощью стерильного фильтра 0,45/0,22 мкм, за которым сразу расположен последующий, встроенный в линию фильтр 0,22 мкм.

15

20

[00245] Разлив готового препарата

[00246] После конечной фильтрации FB заливают в поликарбонатную (-ые) бутыл (-и) Biotainer. Номинальный объем составляет от 20% до 90% от заявленного объема бутыл.

25

[00247] Хранение и перевозка готового препарата

[00248] Условия хранения и перевозки нерасфасованного препарата перед производством лекарственного препарата составляют $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ с защитой от света, если ФВ хранится около одной недели или менее, или $-40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ с защитой от света, если ФВ хранится более одной недели.

[00249] Пример 6. Состав лекарственного препарата: композиция и компоненты первичной упаковки

[00250] В настоящем документе представлена сводная информация в табличной форме о составе композиции лекарственного препарата амивантамаба (таблица 8).

Таблица 8. Композиция лекарственного препарата амивантамаба

Компонент	Композиция	Количество на мл
Амивантамаб	50 мг	50 мг
L-гистидин	10 mM	0,413 мг
Моногидрат гидрохлорида L-гистидина		1,538 мг
Сахароза	8,5% (масс./об.)	85 мг
Полисорбат 80	0,06%	0,60 мг
L-метионин	1,0 мг/мл	1,0 мг
Динатриевая соль EDTA, дигидрат	20 мкг/мл	0,02 мг
Вода для инъекции	доведение до 1,0 мл	доведение до 1,0 мл

[00251] Первичная упаковка лекарственного препарата (ЛП) амивантамаба состоит из стеклянного флакона, полимерной пробки флакона и алюминиевого уплотнения. В таблицах 9 перечислены конкретные компоненты для первичного упаковочного материала.

Таблица 9. Компоненты первичного упаковочного материала

Компонент	Описание
Стеклянный флакон	8 мл, стекло, тип 1, боросиликатное
Пробка	20 мм, бутилкаучук, пробка с покрытием FluroTec
Уплотнения	20 мм, алюминиевое уплотнение с отламываемой крышкой

[00252] Пример 7. Описание исследования стабильности

[00253] Данное исследование проводили для отслеживания характеристик лекарственного препарата амивантамаба, определяющих стабильность при различных условиях окружающей среды и сроках. Исследуемые тестируемые изделия получали посредством аликвотирования нерасфасованного препарата во

флаконы 8R с номинальным объемом 7,5 мл. Флаконы закупоривали, накрывали крышкой и герметизировали путем обжатия

[00254] Все исследования должны были проводиться с флаконами в перевернутом положении.

5 Таблица 10. Параметры исследования

Классификация стабильности	Условия хранения	Продолжительность (месяцы)
В реальном времени	$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	36
Форсированные	$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / относительная влажность (RH) 60%	12
Стрессовые	$40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / RH 75%	6

[00255] Результаты исследования стабильности

[00256] Результаты исследования стабильности для ЛП амивантаба, выдержанного в рекомендуемых, форсированных и стрессовых условиях, приведены ниже. В любой момент времени для ЛП, выдерживаемого в рекомендуемых условиях хранения, все значения результатов для тестируемых параметров, наблюдаемые в рамках каждого анализируемого исследования, соответствовали критериям, соответствующим наиболее предпочтительному варианту осуществления стабильности при выдерживании после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 5°C или в течение около 24 месяцев или более и при температуре около 5°C , или превышали их. ЛП, выдержанный в форсированных условиях (25°C) в течение 12 месяцев, демонстрировал результаты, соответствующие показателям либо наиболее предпочтительных, либо предпочтительных вариантов осуществления стабильности после хранения в течение около 12 месяцев или более и при температуре около 25°C и/или после хранения в течение около 2 лет или более и при температуре около 5°C , или превосходящие их. Аналогичным образом результаты пептидной карты отражали практически полное отсутствие изменений с течением времени в измеренном процентном показателе посттрансляционной модификации.

[00257] Результаты для ЛП амивантаба, выдержанного в форсированных и стрессовых условиях, отражали ожидаемые скорости деградации для лекарственного препарата, подвергнувшегося длительному воздействию форсированных и стрессовых условий хранения. Особо следует отметить, что ЛП, выдержанный в форсированных условиях (25°C) в течение 12 месяцев, демонстрировал результаты,

соответствующие показателям либо наиболее предпочтительных, либо предпочтительных вариантов осуществления стабильности, или превосходящие их.

Данные для 5 °C

Таблица 11. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантаба, хранившегося при 5 °C

Месяцы	Цвет раствора	pH	Мутность (NTU)	Твердые частицы		cSDS-электрофорез (в восстанавливающих условиях)		
				Невидимые ≥ 10 мкм: частиц на флакон	≥ 25 мкм: частиц на флакон	Чистота: %	AG HC: %	новые пики, по сравнению с эталонным материалом
0	≤ BY6, ≤ B7, ≤ Y6	5,8	4,3	65	2	95,1	4,2	Отсутствие нового пика > 1,0%
3	≤ BY7, ≤ B8, ≤ Y7	5,7	4,4	71	1	94,9	4,3	Отсутствие нового пика > 1,0%
6	≤ BY7, ≤ B9, ≤ Y7	5,7	4,1	20	0	95,2	4,1	Отсутствие нового пика > 1,0%
9	≤ BY7, ≤ B7, ≤ Y7	5,9	4,0	89	5	95,0	4,2	Отсутствие нового пика > 1,0%
12	≤ BY7, ≤ B8, ≤ Y7	5,5	4,4	23	1	95,1	4,1	Отсутствие нового пика > 1,0%
18	≤ BY7, ≤ B8, ≤ Y7	5,7	4,2	71	2	95,1	4,1	Отсутствие нового пика > 1,0%
24	≤ BY7, ≤ B8, ≤ Y7	5,6	4,1	16	1	94,9	не исследовали	Отсутствие нового пика > 1,0%
36								

Таблица 11. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 5 °С (продолжение)

Месяцы	сSDS-электрофорез (в невосстанавливающих условиях)		эВЭЖХ			Конц. белка по A ₂₈₀ (мг/мл)
	Чистота (%)	Новый пик (%)	Основной компонент (%)	HMWS (%)	LMWS (%)	
0	98,3	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,2	0,8	< 0,1	53,5
3	98,2	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,1	0,8	< 0,1	53,4
6	98,1	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,1	0,8	< 0,1	53,1
9	98,2	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,1	0,8	< 0,1	53,3
12	98,1	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,1	0,8	< 0,1	53,9
18	98,0	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,0	0,9	0,1	53,7
24	98,1	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	98,9	1,0	не исследовали	52,8
36						

Таблица 11. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 5 °С (продолжение)

Месяцы	КИЭФ			Активность связывания с EGFR относительно эталонного материала (%)	Активность связывания с сМЕТ относительно эталонного материала (%)	Полисорбат 80 (%)
	Главный пик (%)	Сумма кислотных пиков (%)	Сумма щелочных пиков (%)			
0	76	22	< 3,0	108	103	0,0561
3	75	22	< 3,0	107	104	0,0563
6	75	22	< 3,0	127	104	0,0578
9	74	23	< 3,0	92	98	0,0560
12	74	24	2	95	96	0,0597
18	74	23	3	110	100	0,0577
24	73	24	3	101	93	0,0603
36						

Таблица 11. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантаба, хранившегося при 5 °С (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт окисления					
	анти-EGFR HC Met 34* / анти-с-Met не предусмотре- но (н/п)	анти-EGFR HC Met 103* / анти- с-Met н/п	анти-EGFR HC Met 108* / анти-с- Met н/п	анти-EGFR HC Met 260 / анти-с-Met HC Met 254	анти-EGFR HC Met 436 / анти-с-Met HC Met 430	анти-EGFR н/п / анти-с- Met LC Trp 32*, Trp 35
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	0,2	1,6	2,2	2,3	0,7	Результат не опубликован (н/о)
3	0,2	1,2	2,4	2,1	0,7	1,5
6	0,2	1,5	1,7	2,2	0,7	1,7
9	0,2	1,2	3,2	2,4	0,8	2
12	0,4	1,8	1,1	2,8	1,1	1,1
18	0,3	1,7	1,8	2,5	1,0	1,2
24	1,0	2,4	2,5	3,3	1,5	1,5
36						

Таблица 11. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантаба, хранившегося при 5 °С (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт дезамидирования		
	анти-EGFR HC Asn 333* / анти-с-Met HC Asn 327	анти-EGFR HC Asn 392 / анти-с- Met HC Asn 386, Asn 391	анти-EGFR н/п / анти-с- Met HC Asn 55*, 59*
	(%)	(%)	(%)
0	0,7	2,7	4,4
3	0,7	2,2	3,7
6	0,7	2,6	3,6
9	0,8	2	4,4
12	0,8	2,8	3,7
18	0,9	3,1	3,7
24	Не исследовали	3,0	4,2
36			

Таблица 11. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 5 °С (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт изомеризации	
	анти-EGFR HC Asp 53*, Asp 54* / анти-с-Met н/п	анти-EGFR HC Asp 99* / анти-с-Met н/п
	(%)	(%)
0	н/о	1
3	0,4	1
6	0,5	1,2
9	0,5	1,3
12	0,8	1,2
18	0,3	1,6
24	0,5	1,6
36		

Данные для 25 °С

Таблица 12. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 25 °С

Месяцы	Цвет раствора	pH	Мутность (NTU)	Твердые частицы		сSDS-электрофорез (в восстанавливающих условиях)		
				Невидимые		Чистота: %	AG HC: %	новые пики
				≥ 10 мкм: частиц на флакон	≥ 25 мкм: частиц на флакон			
0	≤ BY6, ≤ B7, ≤ Y6	5,8	4,3	65	2	95,1	4,2	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом
3	≤ BY6, ≤ B7, ≤ Y6	5,7	4,3	32	0	94,6	4,1	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом
6	≤ BY7, ≤ B7, ≤ Y7	5,8	4	13	0	93,9	4,1	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом
9	≤ BY7, ≤ B8, ≤ Y7	5,7	4,1	51	1	92,7	4,2	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом
12	≤ BY6, ≤ B6, ≤ Y6	5,7	5	40	3	91,7	4,1	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом

Таблица 12. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 25 °С (продолжение)

Месяцы	сSDS-электрофорез (в невосстанавливающих условиях)		эВЭЖХ			Конц. белка по A ₂₈₀ (мг/мл)
	Чистота (%)	Новый пик (%)	Основной компонент (%)	HMWS (%)	LMWS (%)	
0	98,3	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,2	0,8	< 0,1	53,5
3	97,4	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	98,9	0,9	0,2	52,1
6	96,2	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	98,5	1,0	0,5	53,2
9	95,5	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	98,3	1,0	0,7	53,1
12	94,5	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	98,0	1,1	0,9	53,7

Таблица 12. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 25 °С (продолжение)

Месяцы	КИЭФ			Активность связывания с EGFR относительно эталонного материала (%)	Активность связывания с сМЕТ относительно эталонного материала (%)	Полисорбат 80 (%)
	Главный пик (%)	Сумма кислотных пиков (%)	Сумма щелочных пиков (%)			
0	76	22	2	108	103	0,0561
3	64	32	4	93	101	0,0552
6	56	39	5	82	96	0,0550
9	52	43	5	86	96	0,0578
12	46	48	6	79	89	0,055

Таблица 12. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 25 °C (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт окисления					
	анти-EGFR HC Met 34* / анти-с- Met н/п	анти-EGFR HC Met 103* / анти-с- Met н/п	анти- EGFR HC Met 108* / анти-с- Met н/п	анти-EGFR HC Met 260 / анти-с-Met HC Met 254	анти-EGFR HC Met 436 / анти-с-Met HC Met 430	анти-EGFR н/п / анти-с-Met LC Trp 32*, Trp 35
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	0,2	1,6	2,2	2,3	0,7	Результат не опубликован
3	0,5	1,7	3,1	2,7	1,2	2,5
6	0,4	2,2	1,9	2,6	0,8	4,1
9	0,5	2,3	1,1	2,9	1,2	3,2
12	0,4	2,4	1,3	2,9	1,2	4,0

Таблица 12. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 25 °C (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт дезамидирования		
	анти-EGFR HC Asn 333* / анти-с-Met HC Asn 327	анти-EGFR HC Asn 392 / анти- с-Met HC Asn 386, Asn 391	анти-EGFR н/п / анти-с-Met HC Asn 55*, 59*
	(%)	(%)	(%)
0	0,7	2,7	4,4
3	2,8	3,6	4,8
6	6,3	3,6	5,4
9	Не исследовали	3,9	6,8
12	Не исследовали	4,5	7,8

Таблица 12. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 25 °C (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт изомеризации	
	анти-EGFR HC Asp 53*, Asp 54* / анти-с-Met н/п	анти-EGFR HC Asp 99* / анти-с-Met н/п
	(%)	(%)
0	н/о	1
3	0,7	3,6
6	1,3	1,8
9	2,7	6,1
12	3,1	7,4

Данные для 40 °C

Таблица 13. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 40 °C

Месяцы	Цвет раствора	Мутность (NTU)	Твердые частицы			cSDS-электрофорез (в восстанавливающих условиях)		
			Невидимые	≥ 10 мкм: частиц на флакон	≥ 25 мкм: частиц на флакон	Чистота: %	AG HC: %	новые пики
0	≤ BY6, ≤ B7, ≤ Y6	5,8	4,3	65	2	95,1	4,2	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом
1	≤ BY6, ≤ B6, ≤ Y6	5,8	5,2	167	6	92,2	4,3	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом
3	≤ BY6, ≤ B6, ≤ Y6	5,7	4,9	32	1	88,4	4,2	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом
6	≤ BY6, ≤ B6, ≤ Y6	5,7	5	28	1	82,7	4,4	Пик 2: 1,032%, PI 12,82

Таблица 13. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 40 °C (продолжение)

Месяцы	cSDS-электрофорез (в невосстанавливающих условиях)			эВЭЖХ		Конц. белка по A ₂₈₀ (мг/мл)
	Чистота (%)	Новые пики	Основной компонент (%)	HMWS (%)	LMWS (%)	
0	98,3	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	99,2	0,8	< 0,1	53,5
1	95,5	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	98,4	1,0	0,4	52,7
3	90,7	Отсутствие нового пика > 1,0% по сравнению с эталонным материалом	96,5	1,9	1,6	53,7
6	82,4	Пик 1: 1,19%, PI 12,89	91,5	3,9	4,6	53,3

Таблица 13. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 40 °С (продолжение)

Месяцы	КИЭФ			Активность связывания с EGFR	Активность связывания с cMET	Полисорбат 80
	Главный пик (%)	Сумма кислотных пиков (%)	Сумма щелочных пиков (%)	относительно эталонного материала (%)	относительно эталонного материала (%)	(%)
0	76	22	< 3,0	108	103	0,0561
1	46	47	6	99	97	0,0560
3	23	73	5	63	91	0,0541
6	6	93	< 3,0	33	74	0,0543

Таблица 13. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 40 °С (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт окисления					
	анти-EGFR HC Met 34* / анти-с-Met н/п	анти-EGFR HC Met 103* / анти-с-Met н/п	анти-EGFR HC Met 108* / анти-с-Met н/п	анти-EGFR HC Met 260 / анти-с-Met HC Met 254	анти-EGFR HC Met 436 / анти-с-Met HC Met 430	анти-EGFR н/п / анти-с-Met LC Trp 32*, Trp 35
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	0,2	1,6	2,2	2,3	0,7	Результат не опубликован
1	0,4	1,6	3,1	2,8	0,9	1,8
3	0,6	2,5	4,5	3,4	1,4	7,7
6	0,4	7	5,1	4	1,4	18,8

Таблица 13. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 40 °С (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт дезамидирования		
	анти-EGFR HC Asn 333* / анти-с-Met HC Asn 327	анти-EGFR HC Asn 392 / анти-с-Met HC Asn 386, Asn 391	анти-EGFR н/п / анти-с-Met HC Asn 55*, 59*
	(%)	(%)	(%)
0	0,7	2,7	4,4
1	10,8	4,3	5,8
3	27,9	6,2	10,2
6	51,5	9,5	15,9

Таблица 13. Результаты исследования стабильности для лекарственного препарата амивантамаба, хранившегося при 40 °С (продолжение)

Месяцы	Посттрансляционная модификация — сайт изомеризации	
	анти-EGFR HC Asp 53*, Asp 54* / анти-с-Met н/п	анти-EGFR HC Asp 99* / анти-с-Met н/п
	(%)	(%)
0	н/о	1
1	2,2	5,6
3	4,5	21
6	6,5	18,3

[00258] Специалистам в данной области техники будет очевидно, что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения допускают множество изменений и модификаций и что такие изменения и модификации могут быть сделаны без отклонения от сущности изобретения. Таким образом, предполагается, что прилагаемые пункты формулы изобретения включают все такие эквивалентные вариации, которые соответствуют истинной сущности и объему настоящего изобретения.

[00259] Описания каждого патента, патентной заявки и публикации, цитируемой или описанной в этом документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Таблица 14. Последовательности

SEQ ID NO:	Последовательность
SEQ ID NO: 1 HCDR1, связывающееся с EGFR плечо (метод Кабата)	TYGMH
SEQ ID NO: 2 HCDR2, связывающееся с EGFR плечо (метод Кабата)	VIWDDGSYKYYGDSVKG
SEQ ID NO: 3 HCDR3, связывающееся с EGFR плечо (метод Кабата)	DGITMVRGVMKDYFDY
SEQ ID NO: 4 LCDR1, связывающееся с EGFR плечо (метод Кабата)	RASQDISSALV
SEQ ID NO: 5 LCDR2, связывающееся с EGFR плечо (метод Кабата)	DASSLES
SEQ ID NO: 6 LCDR3, связывающееся с EGFR плечо (метод Кабата)	QQFNSYPLT
SEQ ID NO: 7 HCDR1, связывающееся с с-Met плечо (метод Кабата)	SYGIS
SEQ ID NO: 8 HCDR2, связывающееся с с-Met плечо (метод Кабата)	WISAYNGYTNYAQLQ
SEQ ID NO: 9 HCDR3, связывающееся с с-Met	DLRGTYFDY

SEQ ID NO:	Последовательность
плечо (метод Кабата)	
SEQ ID NO: 10 LCDR1, связывающееся с с-Met плечо (метод Кабата)	RASQGISNWL A
SEQ ID NO: 11 LCDR2, связывающееся с с-Met плечо (метод Кабата)	AASSLLS
SEQ ID NO: 12 LCDR3, связывающееся с с-Met плечо (метод Кабата)	QQANSFPIT
SEQ ID NO: 13 VH1, связывающееся с EGFR плечо	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD DGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 14 VL1, связывающееся с EGFR плечо	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG VPSRFGSGESGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQFNSYPLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 15 VH2, связывающееся с с-Met плечо	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAY NGYTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 16 VL2, связывающееся с с-Met плечо	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLS GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQANSFPITFGQGLTRLEIK
SEQ ID NO: 17 HC1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD DGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGV MKDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 18 LC1	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG VPSRFGSGESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 19 HC2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAY NGYTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
SEQ ID NO: 20 LC2	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLS GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGLTRLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильная водная фармацевтическая композиция, содержащая:

а) от около 44 мг/мл до около 56 мг/мл биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met), причем биспецифическое антитело содержит:

первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область 1 HC1 (VH1);

первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область 1 легкой цепи (VL1);

вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область 2 HC2 (VH2); и

вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область 2 легкой цепи (VL2),

при этом VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно;

б) от около 8 мМ до около 12 мМ гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина,

с) от около 6,8% (масс./об.) до около 10,2% масс./об. сахарозы,

д) от около 0,036% (масс./об.) до около 0,084% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80),

е) от около 0,8 мг/мл до около 1,2 мг/мл метионина,

ф) от около 16 мкг/мл до около 24 мкг/мл этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); и

г) pH от около 5,2 до около 6,2.

2. Стабильная водная фармацевтическая композиция по п. 1, в которой биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область LC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.
5
3. Стабильная водная фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, в которой биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и
10 переменную область LC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.
4. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–3, в которой HC1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, а LC1
15 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.
5. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–4, в которой HC2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19, а LC2
20 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20.
6. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–5, в которой биспецифическое антитело к EGFR-cMet представляет собой амивантамаб.
7. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–6, в которой
25 биспецифическое антитело к EGFR-cMet имеет концентрацию около 50 мг/мл.
8. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–7, в которой гистидин и/или фармацевтически приемлемая соль гистидина имеют концентрацию
около 10 мМ.
- 30 9. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–8, в которой гистидин и/или фармацевтически приемлемая соль гистидина содержит L-гистидин и моногидрат гидрохлорида L-гистидина.

10. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–9, содержащая около 8,5% (масс./об.) сахарозы.
- 5 11. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–10, содержащая около 0,06% (масс./об.) PS80.
12. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–11, в которой метионин имеет концентрацию около 1 мг/мл.
- 10 13. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–12, в которой EDTA имеет концентрацию около 20 мкг/мл.
14. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–13, pH которой составляет около 5,7.
- 15 15. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–14, содержащая 50 мг/мл биспецифического антитела к EGFR-cMet, 10 мМ гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина, 8,5% (масс./об.) сахарозы, 0,06% (масс./об.) PS80, 1 мг/мл метионина и 20 мкг/мл EDTA.
- 20 16. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–15, являющаяся стабильной при температуре около 2–8 °C в течение по меньшей мере двух лет.
- 25 17. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–16, причем стабильность определяется на основании цвета раствора, pH, мутности, числа невидимых частиц, процентного показателя агликозилированной тяжелой цепи (AGHC), процентного показателя нового (-ых) пика (-ов), процентного содержания высокомолекулярных соединений (HMWS), процентного содержания
- 30 низкомолекулярных соединений (LMWS), процентного показателя суммы кислотных пиков, процентного показателя суммы щелочных пиков, концентрации белка, процентного показателя активности связывания с EGFR, процентного показателя активности связывания с cMet, процентного содержания PS80 или любой их комбинации.

18. Стабильная водная фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–17, причем общий объем композиции находится в диапазоне от около 5 мл до около 10 мл.

5 19. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает в себя этапы, на которых вводят субъекту фармацевтическую композицию по любому из пп. 1–18.

20. Способ по п. 19, в котором введение осуществляют внутривенно.

10

21. Способ получения стабильной водной фармацевтической композиции биспецифического антитела, нацеленного на EGFR и cMet, причем биспецифическое антитело, нацеленное на EGFR и cMet, содержит первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область 1 HC1 (VH1); первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область 1 легкой цепи (VL1); вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область 2 HC2 (VH2); и вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область 2 легкой цепи (VL2), при этом VH1 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; VL1 содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно; при этом способ включает в себя этапы, на которых:

объединяют композицию, содержащую около 50 мг/мл биспецифического антитела, около 10 mM гистидина и/или фармацевтически приемлемой соли гистидина, около 8,5% сахарозы и около 1 мг/мл L-метионина с полисорбатом 80 до конечной концентрации около 0,06% (масс./об.) и EDTA до конечной концентрации около 20 мкг/мл, причем стабильная водная фармацевтическая композиция имеет pH около 5,7.

15

20

25

30

22. Способ по п. 21, в котором биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область LC1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.

5

23. Способ по любому из пп. 21–22, в котором биспецифическое антитело к EGFR-cMet содержит переменную область HC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и переменную область LC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

10

24. Способ по любому из пп. 21–23, в котором антитело содержит тяжелую цепь 1 (HC1), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь 1 (LC1), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

15

25. Способ по любому из пп. 21–24, в котором антитело содержит HC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19, и LC2, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20.

20 26. Способ по любому из пп. 21–25, в котором антитело представляет собой амивантамаб.

27. Набор, содержащий стабильную водную фармацевтическую композицию по любому из пп. 1–18 и инструкции по ее применению.

25

28. Изделие, содержащее контейнер со стабильной водной фармацевтической композицией по любому из пп. 1–18.

30 29. Изделие по п. 28, в котором контейнер представляет собой флакон с пробкой, прокалываемой шприцем.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18 для применения в лечении рака.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18 для применения в приготовлении лекарственного средства.

5 32. Применение фармацевтической композиции для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, посредством введения фармацевтической композиции по любому из пп 1–18.

33. Применение фармацевтической композиции по п. 32, причем введение осуществляют внутривенно.