

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036042**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.17**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/40* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201791185**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.07.27**

---

(54) **СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛА АНТИ-PCSK9**

---

(31) **61/512,666**

(56) US-A1-20100166768  
WO-A1-2011053759  
WO-A2-2004055164

(32) **2011.07.28**

(33) **US**

(43) **2018.01.31**

(62) **201490370; 2012.07.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Уолш Скотт, Дикс Дэниел (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В изобретении представлены фармацевтические составы, содержащие человеческое антитело, которое специфически связывает человеческую пропротеин конвертазу субтилизин/кексин тип 9 протеазу (PCSK9). Составы, кроме антитела анти-PCSK9, могут содержать по крайней мере одну аминокислоту, по крайней мере один сахар или по крайней мере одно неионогенное поверхностно-активное вещество. Фармацевтические составы настоящего изобретения демонстрируют значительный уровень стабильности антитела после хранения в течение нескольких месяцев.

**B1**

**036042**

**036042  
B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к лекарственным препаратам на основе антител. Более конкретно настоящее изобретение относится к области лекарственных средств, содержащих человеческое антитело, которые специфически связывают человеческую пропротеин конвертазу субтилизин/кексин тип 9 протеазу (PCSK9).

### Перечень последовательностей

К настоящему описанию прилагается текстовый файл с перечнем последовательностей, соответствующий требованиям ST.25. Содержание текстового файла в силу ссылки на него включается в настоящий документ. Прилагаемая бумажная копия перечня последовательностей, идентичная по содержанию текстовому файлу, который соответствует требованиям ST.25, является частью настоящего описания.

### Уровень техники

Лекарственные препараты на основе макромолекул (например, антител) должны состояться не только так, чтобы молекулы можно было бы вводить пациентам, но обеспечивать их стабильность во время хранения и последующего использования. Например, лекарственные препараты на основе антител в жидких растворах склонны к разложению, агрегированию или нежелательной химической модификации, если состав раствора не составлен надлежащим образом. Стабильность того или иного антитела в жидком составе зависит не только от природы вспомогательных средств, используемых в составе, но также и от количеств и относительного соотношения различных вспомогательных средств. Более того, при подготовке жидких препаратов на основе антител следует учитывать и другие соображения, кроме стабильности. К примерам таких дополнительных соображений относятся вязкость раствора и концентрация антитела, которая может достигаться в определенном составе, а также визуальное качество или привлекательность состава. Поэтому к разработке состава лекарственного препарата на основе антител следует подходить с особым вниманием, с тем чтобы получить препарат, который сохраняет стабильность, содержит достаточную концентрацию антитела, а также обладает приемлемой вязкостью и другими свойствами, которые позволяют удобным образом вводить состав пациентам.

Антитела к пропротеин конвертазе субтилизин/кексин тип 9 протеазе белка человека (PCSK9) являются одним из примеров терапевтически важной макромолекулы, из которой необходимо надлежащим образом приготовить фармацевтический состав. Антитела анти-PCSK9 клинически используются для лечения или профилактики таких заболеваний, как гиперхолестеринемия и другие дислипидемии, а также других отклонений. Примеры антител анти-PCSK9 описаны, среди прочего, в заявках WO 2008/057457, WO 2008/057458, WO 2008/057459, WO 2008/063382, WO 2008/125623, патенте США № 7572618, заявках WO 2010/077854, US 2010/0166768 и US 2011/0065902.

Несмотря на то что антитела анти-PCSK9 известны специалистам в области, по-прежнему сохраняется потребность в новых фармацевтических составах, содержащих антитела анти-PCSK9, которые достаточно стабильны и пригодны для введения пациентам.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение восполняет упомянутую выше потребность, предлагая лекарственные средства, содержащие человеческое антитело, которое специфически связывает человеческую пропротеин конвертазу субтилизин/кексин тип 9 протеазу (PCSK9).

Настоящее изобретение относится к жидкому фармацевтическому составу, включающему:

(a)  $150 \pm 22,5$  мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают человеческую пропротеиновую конвертазу субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), где антитело содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO: 2, HCDR2 с SEQ ID NO: 3, HCDR3 с SEQ ID NO: 4, определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

(b)  $10 \pm 1,5$  mM гистидина (pH  $6,0 \pm 0,3$ );

(c)  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об. полисорбата 20 и

(d)  $10 \pm 1,5\%$  вес./об. сахарозы.

В одном из вариантов осуществления жидкого фармацевтического состава по изобретению антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (HCVD), содержащий SEQ ID NO: 1, и вариабельный домен легкой цепи (LCVD), содержащий SEQ ID NO: 5.

В другом варианте осуществления более 90% антител имеет молекулярный вес  $155 \pm 1$  кДа; более 50% антител имеет изоэлектрическую точку около 8,5 и от 75 до 90% антител фукозилированы.

В следующем варианте осуществления по меньшей мере 91% антитела жидкого фармацевтического состава имеет нативную конформацию через 28 дней при  $45^\circ\text{C}$ .

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере 35% антитела жидкого фармацевтического состава остается в главной заряженной форме через 28 дней при  $45^\circ\text{C}$ .

В следующем варианте осуществления по меньшей мере 94% антитела имеют нативную конформацию через 6 месяцев при  $25^\circ\text{C}$ .

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере 45% антитела остается в главной заряженной форме через 6 месяцев при  $25^\circ\text{C}$ .

В другом варианте осуществления в жидком фармацевтическом составе по меньшей мере 96% антитела имеет нативную конформацию через 6 месяцев при 5°C.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере 58% антитела остается в главной заряженной форме через 6 месяцев при 5°C.

В еще одном варианте осуществления по меньшей мере 96% антитела остается в главной заряженной форме через три месяца при -20, -30 или -80°C.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере 56% антитела остаются в главной заряженной форме через три месяца при -20, -30 или -80°C.

В следующем варианте изобретения жидкий фармацевтический состав содержит 150 мг/мл антитела.

Другие осуществления настоящего изобретения станут очевидны при ознакомлении с приведенным ниже подробным описанием.

### **Подробное описание изобретения**

Прежде чем приступить к описанию настоящего изобретения необходимо отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными способами и изложенными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут меняться. Следует также понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных осуществлений и не носит ограничительного характера, поскольку охват настоящего изобретения ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое общеизвестно рядовым специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин "примерно" в отношении конкретного упоминаемого численного значения или диапазона значений подразумевает, что значение может отклоняться от значения не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "примерно 100" охватывает 99 и 101 и все значения между ними (то есть 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя на практике или при проверке настоящего изобретения могут использоваться любые способы и материалы, аналогичные или идентичные описанным в настоящем документе, ниже приводится описание предпочтительных способов и материалов. Все публикации, упоминаемые в настоящем документе, включаются в него полностью в силу ссылки на них.

Фармацевтические составы.

Используемое в настоящем документе выражение "фармацевтический состав/препарат" означает смесь по крайней мере одного активного ингредиента (например, малой молекулы, макромолекулы, соединения и пр., которые в состоянии оказывать биологическое воздействие на человека или на животных) и по крайней мере одного неактивного ингредиента, который в сочетании с активным ингредиентом или одним или несколькими неактивными ингредиентами пригоден для терапевтического применения на человеке или животном. Термин "состав/препарат", используемый в настоящем документе, если специально не оговорено иначе, означает "фармацевтический состав/препарат". Настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим по крайней мере один лечебный полипептид. В соответствии с определенными осуществлениями настоящего изобретения под лечебным полипептидом понимается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с человеческой пропротеин конвертазой субтилизин/кексин тип 9 (PCSK9). Более конкретно настоящее изобретение включает фармацевтические препараты, которые содержат (i) человеческое антитело, которое специфически связывается с человеческой PCSK9; (ii) гистиридиновый буфер; (iii) органический вспомогательный растворитель, который представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество; (iv) термический стабилизатор, которым является углевод; и в некоторых случаях (v) понизитель вязкости, которым является соль. Конкретные примеры компонентов и составов, включенных в настоящее изобретение, подробно описаны ниже.

Антитела, которые специфически связываются с PCSK9.

Фармацевтические составы настоящего изобретения могут включать человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с человеческой PCSK9. Используемый в настоящем документе термин "PCSK9" означает пропротеин конвертазу человека, относящуюся к подсемейству протеиназ К семейства секреторных субтилаз. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что PCSK9 повышает уровень ЛНП в плазме за счет связывания с рецептором частиц липопротеинов низкой плотности и стимулирования его распада. Пример аминокислотной последовательности человеческой PCSK9 приводится в SEQ ID NO: 9. Антитела к человеческой PCSK9 описаны в публикациях патентных заявок US 2010/0166768, US 2011/0065902 и WO 2010/077854.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" в общем случае предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, составленных из четырех полипептидных цепей, при этом две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи связываются друг с другом дисульфидными связями, а также для обозначения их мультимеров (например, IgM); при этом молекулы иммуноглобулина, содержащие только тяжелые цепи (то есть без легких цепей), также включаются в охват термина "антитело". Каждая тя-

железа цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе HCVR, или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе LCVR, или  $V_L$ ) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области  $V_H$  и  $V_L$  могут подразделяться на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), перемежаемые областями с более высоким уровнем консервативности, называемые остовными областями (FR). Каждая область  $V_H$  и  $V_L$  образована тремя CDR и четырьмя FR, расположенными от аминокислотного терминального конца к карбоксилтерминальному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Если специально не оговорено иначе, термин "антитело", используемый в настоящем документе, следует понимать, как включающий полные молекулы антител, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела (или просто "часть антитела" или "фрагмент антитела") обозначает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с PCSK9 человека или с его эпитопом.

Используемый в настоящем документе термин "изолированное антитело" предназначен для обозначения антитела, существенно свободного от других антител, обладающих иной антигенной специфичностью (например, изолированное антитело, которое специфически связывает PCSK9 человека, существенно свободно от антител, которые специфически связывают антигены, отличные от PCSK9 человека).

Термин "специфически связываются" или ему подобные означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который сравнительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может описываться константой диссоциации по крайней мере примерно  $1 \times 10^{-6}$  М или выше. Методы определения специфического связывания молекул известны специалистам в области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и пр. Изолированное антитело, которое специфически связывает PCSK9 человека, тем не менее, может проявлять перекрестную реактивность к другим антигенам, например молекулам PCSK9 из других видов (ортологов). В контексте настоящего изобретения мультиспецифические (например, биспецифические) антитела, которые связываются с человеческой PCSK9, а также одним или несколькими другими антигенами, считаются "специфически связывающимися" с человеческой PCSK9. Более того, изолированное антитело может быть существенно свободно от иных клеточных материалов или химических реагентов.

Примеры античеловеческих антител PCSK9, которые могут входить в фармацевтические составы настоящего изобретения, приводятся в публикациях патентных заявок US 2010/0166768, US 2011/0065902 и WO 2010/077854, раскрытие которых в силу ссылки на них полностью включается в текст настоящего документа.

В соответствии с определенными осуществлениями настоящего изобретения античеловеческое антитело PCSK9 mAb-316P представляет собой человеческий IgG1, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет субтипIGHV3-23, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет субтипIGKV4-1 (см. Barbie and Lefranc, The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments, Exp. Clin. Immunogenet. 1998; 15:171-183 и Scaviner, D. et al., Protein Displays of the Human Immunoglobulin Heavy, Kappa and Lambda Variable and Joining Regions, Exp. Clin. Immunogenet., 1999; 16:234-240).

В некоторых осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 mAb-316P содержит по крайней мере одно аминокислотное замещение, что приводит к изменению заряда на внешней поверхности антитела относительно эмбриональной последовательности IGKV4-1. Эмбриональная последовательность IGKV4-1 и номера позиций аминокислот, приведенные в настоящем документе, соответствуют Международной иммуногенетической информационной системе (IMGT), которая описана в Lefranc, M.-P., et al., IMGT®, the international Immunogenetics information system®, Nucl. Acids Res, 37, D1006-D1012 (2009). В некоторых осуществлениях внешняя поверхность включает определяющую комплементарность область (CDR). В некоторых осуществлениях аминокислотное замещение или замещения выбираются из группы, включающей замещение незаряженной полярной аминокислоты на основную аминокислоту в пределах CDR1 (например в положении 32) IGKV4-1. Уникальные пермутации в распределении зарядов антитела, особенно на границе со средой (например в CDR), предположительно будут создавать непредсказуемые условия для поддержания или улучшения стабильности антитела в растворе.

В некоторых осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 mAb-316P содержит по крайней мере одно аминокислотное замещение, что приводит к изменению заряда в остовой области вариабельной области антитела относительно эмбриональной последовательностиIGHV3-23 или эмбриональной последовательностиIGKV4-1. В некоторых осуществлениях аминокислотное замещение или замещения выбираются из группы, включающей (а) замещение полярной аминокислоты в остовой области 3 (FR3) (например, в положении 77)IGHV3-23 на гидрофобную аминокислоту, и (б) замещение основной аминокислоты в остовой области 2 (FR2) (например, в положении 51)IGKV4-1 на полярную аминокислоту.

Изменения в способности пептидной цепи к фолдингу, особенно в пределах остоной области, которая влияет на интерфейс между CDR и растворителем, будет, предположительно, создавать непредсказуемые условия для поддержания или улучшения стабильности антитела в растворе.

В соответствии с рядом осуществлений настоящего изобретения античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь определяющей комплементарность области (HCDR) 1 из SEQ ID NO: 2, HCDR2 из SEQ ID NO: 3 и HCDR3 из SEQ ID NO: 4. В некоторых осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVD из SEQ ID NO: 1.

В соответствии с рядом осуществлений настоящего изобретения античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую (каппа) цепь определяющей комплементарность области (LCDR) 1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO: 7 и LCDR3 из SEQ ID NO: 8. В некоторых осуществлениях античеловеческое антитело PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVD из SEQ ID NO: 5.

Неограничивающий пример антитела, используемый в примерах, называют "mAb-316P". Такое антитело, которое в US 7608693 также называлось H4H098P. mAb-316P (H4H098P) содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NOs: 1/5, а также домены HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3, представленные последовательностями SEQ ID NOs: 2-3-4/ SEQ ID NOs: 6-7-8.

Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащееся в фармацевтических составах настоящего изобретения, можно менять в зависимости от желаемых конкретных свойств составов, а также конкретных обстоятельств и целей, для достижения которых предполагается использовать составы. В определенных осуществлениях фармацевтическими составами являются жидкие препараты, которые могут содержать от  $50 \pm 7,5$  до  $250 \pm 37,5$  мг/мл антитела; от  $60 \pm 9$  до  $240 \pm 36$  мг/мл антитела; от  $70 \pm 10,5$  до  $230 \pm 34,5$  мг/мл антитела; от  $80 \pm 12$  до  $220 \pm 33$  мг/мл антитела; от  $90 \pm 13,5$  до  $210 \pm 31,5$  мг/мл антитела; от  $100 \pm 15$  до  $200 \pm 30$  мг/мл антитела; от  $110 \pm 16,5$  до  $190 \pm 28,5$  мг/мл антитела; от  $120 \pm 18$  до  $180 \pm 27$  мг/мл антитела; от  $130 \pm 19,5$  до  $170 \pm 25,5$  мг/мл антитела; от  $140 \pm 21$  до  $160 \pm 24$  мг/мл антитела;  $150 \pm 22,5$  антитела или  $175 \pm 26,25$  мг/мл. Например, составы настоящего изобретения могут содержать примерно 50; примерно 60; примерно 65; примерно 70; примерно 75; примерно 80; примерно 85; примерно 90; примерно 95; примерно 100; примерно 105; примерно 110; примерно 115; примерно 120; примерно 125; примерно 130; примерно 135; примерно 140; примерно 145; примерно 150; примерно 155; примерно 160; примерно 165; примерно 170; примерно 175; примерно 180; примерно 185; примерно 190; примерно 195; примерно 200; примерно 205; примерно 210; примерно 215; примерно 220; примерно 225; примерно 230; примерно 235; примерно 240; примерно 245 или примерно 250 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с человеческим PCSK9.

Вспомогательные вещества и pH.

Лекарственные препараты настоящего изобретения могут также содержать одно или несколько вспомогательных веществ. Используемый в настоящем документе термин "вспомогательное вещество" означает любой нелекарственный агент, добавляемый к препарату для достижения необходимой консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта.

В некоторых осуществлениях фармацевтический препарат настоящего изобретения содержит по крайней мере один органический вспомогательный растворитель такого рода и в таких количествах, которые стабилизируют человеческое антитело PCSK9 при грубом обращении или взбалтывании, например при встряхивании. В некоторых осуществлениях под "стабилизируют" понимается предупреждение образования более 3% агрегированного антитела от общего количества антитела (на молярной основе) при грубом воздействии. В некоторых осуществлениях под грубым воздействием понимают встряхивание раствора, содержащего антитело и органический вспомогательный растворитель в течение примерно 60 или примерно 120 мин.

В некоторых осуществлениях органическим вспомогательным растворителем является неионогенное поверхностно-активное соединение, например алкилполиэтиленоксид. К характерным неионогенным поверхностно-активным веществам, которые могут входить в препарат настоящего изобретения, относятся, например, полисорбаты, например полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полочсамеры, например полочсамер 181, полочсамер 188, полочсамер 407 или полиэтиленгликоль (PEG). Полисорбат 20 также известен под названием TWEEN 20, сорбитан монолаурат и полиоксиэтиленсорбитан монолаурат. Полочсамер 188 также известен как PLURONIC F68.

Количество неионогенного поверхностно-активного вещества, содержащееся в фармацевтических составах настоящего изобретения, можно менять в зависимости от желаемых конкретных свойств составов, а также конкретных обстоятельств и целей, для достижения которых предполагается использовать составы. В некоторых осуществлениях составы могут содержать от  $0,01 \pm 0,0015$  до  $0,2 \pm 0,03\%$  поверхностно-активного вещества. Например, составы настоящего изобретения могут содержать примерно 0,0085, примерно 0,01, примерно 0,02, примерно 0,03, примерно 0,04, примерно 0,05, примерно 0,06, примерно

0,07, примерно 0,08, примерно 0,09, примерно 0,1, примерно 0,11, примерно 0,12, примерно 0,13, примерно 0,14, примерно 0,15, примерно 0,16, примерно 0,17, примерно 0,18, примерно 0,19, примерно 0,20, примерно 0,21, примерно 0,22 или примерно 0,23% полисорбата 20 или поллоксамера 188.

Фармацевтические препараты настоящего изобретения могут также содержать один или несколько стабилизаторов такого рода и в таких количествах, которые стабилизируют человеческое антитело PCSK9 в условиях теплового стресса. В некоторых осуществлениях "стабилизируют" означает сохранение более примерно 91% антитела в нативной конформации в условиях, когда раствор, содержащий антитело и термический стабилизатор, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно до 28 дней. В некоторых осуществлениях под "стабилизируют" означает агрегирование менее примерно 6% антитела в условиях, когда раствор, содержащий антитело и термический стабилизатор, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно 28 дней. Используемый в настоящем документе термин "нативный" означает основную форму антитела, которая определяется по эксклюзионной хроматографии и обычно представляет собой интактный мономер антитела.

В некоторых осуществлениях термическим стабилизатором является сахар или сахароспирт, выбираемый из сахарозы, трегалозы и маннитола или любого их сочетания, количество которого в препарате можно менять в зависимости от конкретных обстоятельств и целей, для достижения которых предполагается использовать составы. В некоторых осуществлениях препараты могут содержать от примерно 3 до примерно 14%, от примерно 4 до примерно 13%, от примерно 5 до примерно 12%; от примерно 6 до примерно 11%; от примерно 7 до примерно 10%; от примерно 8 до примерно 9%; от примерно 4 до примерно 6%; от примерно 5 до примерно 7%; от примерно 9 до примерно 11% или от примерно 11 до примерно 13% сахара или сахароспирта. Например, фармацевтические препараты настоящего изобретения могут содержать 4±0,6%; 5±0,75%; 6±0,9%; 7±1,05%; 8±1,2%; 9±1,35%; 10±1,5%; 11±1,65%; 12±1,8%; 13±1,95% или примерно 14±2,1% сахара или сахароспирта (например, сахарозы, трегалозы или маннитола).

Фармацевтические препараты настоящего изобретения могут также содержать буфер или буферную систему, которые служат для поддержания стабильного pH и способствуют стабилизации человеческого антитела PCSK9. В некоторых осуществлениях под "стабилизируют" означает агрегирование менее примерно 4,5±0,5% или менее 6,0±0,5% антитела в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях "стабилизируют" означает агрегирование менее примерно 3±0,5% или менее 2,6±0,5% антитела в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 37°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях под "стабилизируют" понимается, что по крайней мере 91±0,5% или по крайней мере 92±0,5% антитела по данным эксклюзионной хроматографии остается в своей нативной конформации в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях под "стабилизируют" понимается, что по крайней мере 94±0,5% или по крайней мере 95±0,5% антитела по данным эксклюзионной хроматографии остается в своей нативной конформации в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 37°C в течение примерно 28 дней. Под "нативным" или "нативной конформацией" подразумевают долю антитела, которая не подверглась агрегированию или распаду. Это обычно определяется по результатам анализа, при котором определяется относительный размер частиц антитела, например, методом эксклюзионной хроматографии. Неагрегированное и неразложившееся антитело элюируется во фракции, которая идентична нативному антителу и, как правило, является основной фракцией элюата. Агрегированное антитело элюируется во фракции, которая указывает на размеры, превышающие размеры нативного антитела. Разложившееся антитело элюируется во фракции, которая указывает на размеры, меньшие размеров нативного антитела.

В некоторых осуществлениях под "стабилизируют" понимается, что по крайней мере 38±0,5% или по крайней мере 29±0,5% антитела по данным катионообменной хроматографии остается в своей главной заряженной форме в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 45°C в течение примерно 28 дней. В некоторых осуществлениях под "стабилизируют" понимается, что по крайней мере 46±0,5% или по крайней мере 39±0,5% антитела по данным катионообменной хроматографии остается в своей главной заряженной форме в условиях, когда раствор, содержащий антитело и буфер, выдерживают при температуре примерно 37°C в течение примерно 28 дней. Под "главным зарядом" или "главной заряженной формой" подразумевают фракцию антитела, которая элюируется с ионообменной смолы в главном пике, к которому с одной стороны примыкают более "основные" пики, а с другой стороны - более "кислые" пики.

Фармацевтические составы настоящего изобретения могут иметь pH от примерно 5,2 до примерно 6,4. Например, составы настоящего изобретения могут иметь pH примерно 5,5, примерно 5,6, примерно 5,7, примерно 5,8, примерно 5,9, примерно 6,0, примерно 6,1, примерно 6,2, примерно 6,3, примерно 6,4 или примерно 6,5. В некоторых осуществлениях pH составляет 6,0±0,4; 6,0±0,3; 6,0±0,2; 6,0±0,1; примерно 6,0 или 6,0.

В некоторых осуществлениях буфер или буферная система включают по крайней мере один буфер с диапазоном буферной емкости, который полностью или частично перекрывается с интервалом pH 5,5-7,4. В одном осуществлении буфер имеет рКа примерно  $6,0 \pm 0,5$ . В некоторых осуществлениях буфером является гистидиновый буфер. В некоторых осуществлениях гистидин присутствует в концентрации от  $5 \pm 0,75$  до  $15 \pm 2,25$ ; от  $6 \pm 0,9$  до  $14 \pm 2,1$ ; от  $7 \pm 1,05$  до  $13 \pm 1,95$ ; от  $8 \pm 1,2$  до  $12 \pm 1,8$ ; от  $9 \pm 1,35$  до  $11 \pm 1,65$ ;  $10 \pm 1,5$  мМ или примерно 10 мМ. В некоторых осуществлениях буферная система содержит гистидин в концентрации  $10 \pm 1,5$  мМ при pH  $6,0 \pm 0,3$ .

Фармацевтические составы настоящего изобретения могут также содержать одно или несколько вспомогательных веществ, которые служат для поддержания низкой вязкости или для снижения вязкости препаратов, содержащих высокие концентрации лекарственного вещества на основе антитела анти-PCSK9 (например, как правило,  $>150$  мг/мл антитела). В некоторых осуществлениях состав включает аргинин в количествах, достаточных для поддержания вязкости жидкого состава на уровне менее  $20 \pm 3$ , менее  $15 \pm 2,25$  или менее  $11 \pm 1,65$  сП. В некоторых осуществлениях препараты содержат аргинин в количестве, достаточном для поддержания вязкости на уровне не выше  $10,6 \pm 1,59$  сП. В некоторых осуществлениях фармацевтический состав настоящего изобретения содержит аргинин предпочтительно в форме гидрохлорида L-аргинина в концентрации от  $10 \pm 1,5$  до  $90 \pm 13,5$  мМ, от  $20 \pm 3$  до  $80 \pm 12$  мМ, от  $30 \pm 4,5$  до  $70 \pm 10,5$ , от  $40 \pm 6$  до  $60 \pm 9$  или  $50 \pm 7,5$  мМ.

Примеры составов.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения фармацевтический состав представляет собой, как правило, физиологически изотонический жидкий состав с низкой вязкостью, который содержит (i) человеческое антитело, которое специфически связывается с человеческой PCSK9 (например, mAb-316P), в концентрации  $50 \pm 7,5$ ,  $100 \pm 15$ ,  $150 \pm 22,5$  или  $175 \pm 26,25$  мг/мл; (ii) буферную систему, которая поддерживает pH примерно на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахар, который также служит термическим стабилизатором; (iv) органический вспомогательный растворитель, который защищает структурную целостность антитела; и (v) соль аминокислоты, которая служит для поддержания достаточно низкой вязкости для инъекции подходящего объема для подкожного введения.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит замещенную тяжелую цепь вариабельной области типа IGHV3-23 и замещенную легкую цепь вариабельной области типа IGLV4-1 (например, mAb-316P) в концентрации от примерно  $50 \pm 7,5$  до примерно  $175 \pm 26,25$  мг/мл; (ii) буферную систему, содержащую гистидин, которая поддерживает pH примерно на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу; (iv) неионогенный детергент, например полисорбат; и в некоторых случаях (v) соль аргинина.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO: 2, HCDR2 из SEQ ID NO: 3, HCDR3 из SEQ ID NO: 4, LCDR1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO: 7, а также LCDR3 из SEQ ID NO: 8, в концентрации  $175 \pm 26,25$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $10 \pm 1,5$  мМ, который обеспечивает pH на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $5 \pm 0,75\%$  вес./об.; (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об. и (v) гидрохлорид L-аргинина в концентрации  $50 \pm 7,5$  мМ.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO: 2, HCDR2 из SEQ ID NO: 3, HCDR3 из SEQ ID NO: 4, LCDR1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO: 7, а также LCDR3 из SEQ ID NO: 8, в концентрации  $150 \pm 22,5$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $10 \pm 1,5$  мМ, который обеспечивает pH на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $10 \pm 1,5\%$  вес./об. и (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,2 \pm 0,03$  или  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO: 2, HCDR2 из SEQ ID NO: 3, HCDR3 из SEQ ID NO: 4, LCDR1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO: 7, а также LCDR3 из SEQ ID NO: 8, в концентрации примерно  $100 \pm 15$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $20 \pm 3$  мМ, который обеспечивает pH на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $12 \pm 1,8\%$  вес./об. и (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,2 \pm 0,03$  или  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит HCDR1 из SEQ ID NO: 2, HCDR2 из SEQ ID NO: 3, HCDR3 из SEQ ID NO: 4, LCDR1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO: 7, а также LCDR3 из SEQ ID NO: 8, в концентрации  $50 \pm 7,5$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $10 \pm 1,5$  мМ, который обеспечивает pH на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $6 \pm 0,9\%$  вес./об. и (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,1 \pm 0,015\%$  вес./об. или  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит вариабельную

область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO: 5 в концентрации  $175 \pm 26,25$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $10 \pm 1,5$  мМ, который обеспечивает рН на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $5 \pm 0,75\%$  вес./об.; (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об. и (v) гидрохлорид L-аргинина в концентрации  $50 \pm 7,5$  мМ.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO: 5 в концентрации примерно  $150 \pm 22,5$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $10 \pm 1,5$  мМ, который обеспечивает рН на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $10 \pm 1,5\%$  вес./об. и (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,2 \pm 0,03$  или  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO: 5 в концентрации примерно  $100 \pm 15$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $20 \pm 3$  мМ, который обеспечивает на уровне рН  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $12 \pm 1,8\%$  вес./об. и (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,2 \pm 0,03$  или  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об.

В соответствии с одним из осуществлений фармацевтический состав содержит (i) человеческое антитело IgG1, которое специфически связывает человеческую PCSK9 и которое содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO: 5 в концентрации примерно  $50 \pm 7,5$  мг/мл; (ii) гистидин в концентрации  $10 \pm 1,5$  мМ, который обеспечивает рН на уровне  $6,0 \pm 0,3$ ; (iii) сахарозу в концентрации  $6 \pm 0,9\%$  вес./об. и (iv) полисорбат 20 в концентрации  $0,1 \pm 0,015$  или  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об.

Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтических составов, входящих в сферу охвата настоящего изобретения, раскрываются в других разделах настоящего документа, в том числе в демонстрационных примерах, приведенных ниже.

Стабильность и вязкость фармацевтических составов.

Фармацевтические составы настоящего изобретения, как правило, отличаются высокими уровнями стабильности. Термин "стабильный", который используется в настоящем документе в отношении фармацевтических составов, означает, что антитела в фармацевтических составах сохраняют приемлемый уровень химической структуры или биологической функции после хранения в определенных условиях. Состав может быть стабильным, даже несмотря на то, что содержащееся в нем антитело не сохраняет 100% своей химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. В определенных обстоятельствах сохранение примерно 90, примерно 95, примерно 96, примерно 97, примерно 98 или примерно 99% структуры или функции антитела после хранения в течение определенного периода времени может рассматриваться как "стабильность".

Стабильность, кроме прочего, может измеряться по определяемому проценту нативного антитела, который остается в составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре. Процент нативного антитела может определяться, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии [эксклюзионная ВЭЖХ]), при этом под нативным понимается неагрегированное и неразложившееся антитело. Используемое в настоящем документе выражение "приемлемый уровень стабильности" означает, что после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре в препарате может обнаруживаться по крайней мере 90% нативной формы антитела. В некоторых осуществлениях после хранения в течение определенного времени при определенной температуре в препарате можно зарегистрировать по крайней мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% нативной формы антитела. Заданный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по крайней мере 14, по крайней мере 28 дней, по крайней мере 1, по крайней мере 2, по крайней мере 3, по крайней мере 4, по крайней мере 5, по крайней мере 6, по крайней мере 7, по крайней мере 8, по крайней мере 9, по крайней мере 10, по крайней мере 11, по крайней мере 12, по крайней мере 18, по крайней мере 24 месяца или более. Заданной температурой, при которой может храниться фармацевтический состав при определении стабильности, может быть любая температура от примерно  $-80$  до примерно  $45^\circ\text{C}$ , например хранение примерно при  $-80$ , примерно  $-30$ , примерно  $-20$ , примерно  $0$ , примерно  $4-8$ , примерно  $5$ , примерно  $25$ , примерно  $35$ , примерно  $37$  или примерно  $45^\circ\text{C}$ . Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если через 6 месяцев хранения при  $5^\circ\text{C}$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 95, 96, 97 или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через 6 месяцев хранения при  $25^\circ\text{C}$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 94, 95, 96, 97 или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через 28 дней хранения при  $45^\circ\text{C}$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при  $-20^\circ\text{C}$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 96, 97 или 98% нативного антитела. Фармацев-



тический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при  $-30^{\circ}\text{C}$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 96, 97 или 98% нативного антитела. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ регистрируется более чем примерно 96, 97 или 98% нативного антитела.

Стабильность, кроме прочего, может измеряться по определяемому проценту антитела, которое образует агрегаты в составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре, причем стабильность обратно пропорциональна проценту образовавшегося агрегата. Процент агрегированного антитела может определяться, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии [экслюзионная ВЭЖХ]). Используемое в настоящем документе выражение "приемлемый уровень стабильности" означает, что после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре в препарате может обнаруживаться не больше 6% антитела в агрегированной форме. В некоторых осуществлениях после хранения в течение определенного времени при определенной температуре в препарате может регистрироваться не больше примерно 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% агрегированного антитела. Заданный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по крайней мере 2 недели, по крайней мере 28 дней, по крайней мере 1, по крайней мере 2, по крайней мере 3, по крайней мере 4, по крайней мере 5, по крайней мере 6, по крайней мере 7, по крайней мере 8, по крайней мере 9, по крайней мере 10, по крайней мере 11, по крайней мере 12, по крайней мере 18, по крайней мере 24 месяцев или более. Заданной температурой, при которой может храниться фармацевтический состав при определении стабильности, может быть любая температура от примерно  $-80$  до примерно  $45^{\circ}\text{C}$ , например хранение примерно при  $-80$ , примерно  $-30$ , примерно  $-20$ , примерно  $0$ , примерно  $4-8$ , примерно  $5$ , примерно  $25$ , примерно  $35$ , примерно  $37$  или примерно  $45^{\circ}\text{C}$ . Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  регистрируется менее чем примерно 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела в агрегированной форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  регистрируется менее чем примерно 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела в агрегированной форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через 28 дней хранения при  $45^{\circ}\text{C}$  регистрируется менее чем примерно 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела в агрегированной форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через три месяца хранения при  $-20$ ,  $-30$  или  $-80^{\circ}\text{C}$  регистрируется менее чем примерно 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела в агрегированной форме.

Стабильность, кроме прочего, может измеряться по определяемому проценту антитела, которое переходит в более кислую фракцию в процессе ионного обмена ("кислая форма"), по сравнению с главной фракцией антитела ("главная заряженная форма"), причем стабильность обратно пропорциональна доле антитела в кислой форме. Не накладывая какие-либо теоретические ограничения, можно отметить, что деамидирование антитела может привести к повышению отрицательного заряда антитела, а значит, к его более высокой кислотности по сравнению с недеамидированным антителом (см., например, Robinson, N., Protein Deamidation, PNAS, April 16, 2002, 99(8):5283-5288). Процент "подкисленного" антитела можно определять, среди прочего, с помощью ионообменной хроматографии (например, высокоэффективной жидкостной катионообменной хроматографии [катионообменная ВЭЖХ]). Используемое в настоящем документе выражение "приемлемый уровень стабильности" означает, что после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре в препарате может обнаруживаться не более 49% антитела в более кислой форме. В некоторых осуществлениях приемлемый уровень стабильности означает, что после хранения в течение определенного времени при определенной температуре в препарате может регистрироваться не более примерно 49, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела в кислой форме. Заданный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по крайней мере 2 недели, по крайней мере 28 дней, по крайней мере 1, по крайней мере 2, по крайней мере 3, по крайней мере 4, по крайней мере 5, по крайней мере 6, по крайней мере 7, по крайней мере 8, по крайней мере 9, по крайней мере 10, по крайней мере 11, по крайней мере 12, по крайней мере 18, по крайней мере 24 месяцев или более. Заданной температурой, при которой можно хранить фармацевтический состав при определении стабильности, может быть любая температура от примерно  $-80$  до примерно  $45^{\circ}\text{C}$ , например хранение примерно при  $-80$ , примерно  $-30$ , примерно  $-20$ , примерно  $0$ , примерно  $4-8$ , примерно  $5$ , примерно  $25$  или примерно  $45^{\circ}\text{C}$ . Например, фармацевтический состав может считаться стабильным, если через три месяца хранения при  $-80$ ,  $-30$  или  $-20^{\circ}\text{C}$  менее чем примерно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела оказывается в более кислой форме.

Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  менее чем примерно 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела оказывается в более кислой форме. Фармацевтический состав может считаться стабильным, если через шесть месяцев хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  менее чем примерно 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела оказывается в более кислой форме. Фармацевтический состав может также считаться стабильным, если через 28 дней хранения при  $45^{\circ}\text{C}$  менее чем при-

мерно 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% антитела оказывается в более кислой форме.

Для оценки стабильности составов настоящего изобретения могут использоваться и другие методы, например дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), для определения термической стабильности, контролируемое встряхивание для определения механической стабильности и поглощение примерно при 350 или примерно при 405 нм для определения мутности раствора. Например, состав настоящего изобретения может считаться стабильным, если через 6 или более месяцев хранения при температуре от примерно 5 до примерно 25°C изменение OD<sub>405</sub> состава будет менее примерно 0,05 (например 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) по сравнению с OD<sub>405</sub> состава в начальный момент времени.

Измерение биологической активности или аффинности связывания антитела с его мишенью также может использоваться для оценки стабильности. Например, состав настоящего изобретения может считаться стабильным, если после хранения при, например, 5, 25, 45°C и пр. в течение определенного периода времени (например от 1 до 12 месяцев) антитело анти-PCSK9, которое содержится в составе, связывается с PCSK9 с аффинностью, которая составляет по крайней мере 90, 95% или более от аффинности связывания антитела до упомянутого хранения. Аффинность связывания может определяться, например, с помощью ELISA или плазмонного резонанса. Биологическая активность может определяться по анализу активности PCSK9, например взаимодействию клетки, которая экспрессирует PCSK9, с составом, содержащим антитело анти-PCSK9. Связывание антитела с такой клеткой может измеряться напрямую, например, с помощью анализа FACS. В альтернативном варианте последующая активность системы PCSK9 может измеряться в присутствии антитела и сопоставляться с активностью системы PCSK9 в отсутствие антитела. В некоторых осуществлениях PCSK9 может быть эндогенной для клетки. В других осуществлениях PCSK9 может эктопически экспрессироваться в клетке.

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

Жидкие фармацевтические препараты настоящего изобретения в некоторых осуществлениях могут отличаться низкими или средними уровнями вязкости. Используемый в настоящем документе термин "вязкость" относится к "кинематической вязкости" или "абсолютной вязкости". "Кинематическая вязкость" является показателем резистивного течения жидкости под действием силы тяжести. Если две жидкости равного объема поместить в одинаковые капиллярные вискозиметры и позволить им вытекать под действием силы тяжести, то для прохождения через капилляр вязкой жидкости потребуется больше времени, чем жидкости меньшей вязкости. Например, если одной жидкости для полного вытекания потребуется 200 с, а другой жидкости требуется 400 с, то вторая жидкость считается вдвое более вязкой по сравнению с первой по шкале кинематической вязкости. "Абсолютная вязкость", которую иногда называют динамической или простой вязкостью, представляет собой произведение кинематической вязкости и плотности жидкости (абсолютная вязкость=кинематическая вязкость×плотность). Размерность кинематической вязкости - L<sup>2</sup>/T, где L - длина, а T - время. Кинематическая вязкость обычно выражается в сантистоксах (сСт). Единицей кинематической вязкости в системе СИ является мм<sup>2</sup>/с, равная 1 сСт. Абсолютная вязкость выражается в сантипуазах (сП). В системе СИ единицей абсолютной вязкости является миллипаскаль-секунда (мПа·с), где 1 сП=1 мПа·с.

Используемая в настоящем документе характеристика низкого уровня вязкости в отношении жидкого состава настоящего изобретения будет соответствовать абсолютной вязкости менее примерно 15 сП. Например, жидкий состав настоящего изобретения будет иметь "низкую вязкость", если при регистрации с помощью стандартных методик измерения вязкости состав оказывается имеющим абсолютную вязкость примерно 15, примерно 14, примерно 13, примерно 12, примерно 11, примерно 10, примерно 9, примерно 8 сП или менее. Используемая в настоящем документе характеристика среднего уровня вязкости в отношении жидкого состава настоящего изобретения будет соответствовать абсолютной вязкости в интервале между примерно 35 и примерно 15 сП. Например, жидкий состав настоящего изобретения будет иметь "среднюю вязкость", если при регистрации с помощью стандартных методик измерения вязкости состав оказывается имеющим абсолютную вязкость примерно 34, примерно 33, примерно 32, примерно 31, примерно 30, примерно 29, примерно 28, примерно 27, примерно 26, примерно 25, примерно 24, примерно 23, примерно 22, примерно 21, примерно 20, примерно 19, примерно 18, примерно 17, примерно 16 или примерно 15,1 сП.

Как явствует из приведенных ниже примеров, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что при добавлении в состав антитела аргинина в концентрации от примерно 25 до примерно 100 мМ можно получить жидкие составы с вязкостью от низкой до средней, содержащие высокие концентрации античеловеческого антитела PCSK9 (например от примерно 100 до по крайней мере 200 мг/мл). Кроме того, было также обнаружено, что вязкость состава можно будет снизить в еще большей степени за счет снижения содержания сахарозы до менее чем примерно 10%.

Контейнеры и способы введения.

Фармацевтические составы настоящего изобретения можно помещать в любой контейнер, пригодный для хранения лекарств и других лекарственных препаратов. Например, фармацевтические составы

можно помещать в герметичный и стерилизованный пластиковый или стеклянный контейнер с определенным объемом, например флакон, ампулу, шприц, картридж или бутылку. Для хранения составов настоящего изобретения могут использоваться различные типы флаконов, в том числе, например, прозрачные и непрозрачные (например янтарного цвета) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогичным образом, для хранения или введения фармацевтического состава настоящего изобретения могут использоваться шприцы любого типа.

Фармацевтические составы настоящего изобретения можно помещать в шприцы с "обычным содержанием вольфрама" или шприцы с "низким содержанием вольфрама". Специалистам в области будет очевидно, что процесс изготовления стеклянных шприцев обычно предполагает использование горячего вольфрамового стержня для формирования отверстия в стекле, через которое будут набираться и подаваться жидкости. Такой процесс приводит к отложению следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца. Последующая промывка и другие производственные стадии могут использоваться для снижения содержания вольфрама в шприце. Используемый в настоящем документе термин "обычное содержание вольфрама" означает, что шприц содержит не менее 500 миллиардных долей вольфрама. Термин "низкое содержание вольфрама" означает, что шприц содержит менее 500 миллиардных долей вольфрама. Например, в соответствии с настоящим изобретением шприц с низким содержанием вольфрама содержит менее примерно 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или меньше миллиардных долей вольфрама.

Резиновые поршни, используемые в шприцах, а также резиновые пробки, которыми закрывают флаконы, могут иметь покрытие для предотвращения загрязнения лекарственного содержимого шприца или флакона или же для обеспечения его стабильности. Таким образом, фармацевтические составы настоящего изобретения в соответствии с определенными осуществлениями можно помещать в шприц с покрытым поршнем или же во флакон, который закупоривается резиновой пробкой с покрытием. Например, поршень или пробку можно покрывать пленкой фторуглеродов. Примеры пробок или поршней с покрытием, пригодных для использования с флаконами и шприцами, содержащими фармацевтические составы настоящего изобретения, приводятся, например, в патентах США №№ 4997423; 5908686; 6286699; 6645635 и 7226554, содержание которых в силу ссылки на них полностью включается в текст настоящего документа. Конкретные примеры резиновых пробок и поршней с покрытием, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, серийно выпускаются под торговой маркой "FluroTec®", поставляемой West Pharmaceutical Services, Inc. (Лайонвилль, штат Пенсильвания). FluroTec® является примером фторуглеродного покрытия, которое используется, чтобы свести к минимуму или предотвратить налипание лекарственного вещества на резиновые поверхности.

В соответствии с определенными осуществлениями настоящего изобретения фармацевтические составы можно помещать в шприц с низким содержанием вольфрама и поршнем с фторуглеродным покрытием.

Фармацевтические составы могут вводиться пациенту парентерально, например посредством инъекции (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно и пр.), или посредством чрескожного, чрезслизистого, назального, ингаляционного или перорального введения. Для подкожного введения фармацевтического состава настоящего изобретения могут применяться самые различные конструкции многодозовых шприцов-ручек и устройств для автоматической инъекции. К примерам, среди прочего относятся AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, штат Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручка BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия). К примерам разовых шприцов-ручек или устройств для автоматической инъекции, которые могут применяться для подкожного введения фармацевтического состава настоящего изобретения, среди прочих, относятся шприц-ручка SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоматическое устройство SURECLICK™ (Amgen, Таусенд-Оакс, штат Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штуттгарт, Германия), EPIPEN (Deu, L.P.) и шприц-ручка HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, штат Иллинойс).

Также возможно использовать микроинжектор для доставки фармацевтических составов настоящего изобретения. Используемый в настоящем документе термин "микроинжектор" означает устройство для подкожного введения, предназначенное для медленного вливания больших объемов (например, до 2,5 мл и выше) лекарственного состава в течение продолжительного периода времени (например, примерно 10, 15, 20, 25, 30 или более минут) (см., например, US 6629949; US 6659982; а также Meehan et al., J. Controlled Release 46:107-116 (1996)). Микроинжекторы особенно удобны для доставки больших доз лекарственных белков, содержащихся в высоких концентрациях (например, примерно 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл), или вязких растворов.

В одном осуществлении жидкий фармацевтический препарат, содержащий примерно 175±26,25

мг/мл антитела анти-PCSK9, вводится подкожно в объеме примерно  $1,14 \pm 0,17$  мл в предварительно заполненном шприце. В одном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц объемом 1 мл с тонкостенной иглой размером 27-G, с поршнем из резины с фторуглеродным покрытием и резиновым колпачком иглы. В одном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц OMPИ объемом 1 мл с иглой размером 27-G, с резиновым колпачком иглы FM27 и поршнем из резины с покрытием FLUROTEC® 4023/50.

В одном осуществлении жидкий фармацевтический препарат, содержащий примерно  $150 \pm 22,5$  мг/мл антитела анти-PCSK9, вводится подкожно в объеме примерно  $1 \pm 0,15$  мл в предварительно заполненном шприце. В одном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц объемом 1 мл с тонкостенной иглой размером 27-G, с поршнем из резины с фторуглеродным покрытием и резиновым колпачком иглы. В одном осуществлении в качестве шприца используется длинный стеклянный шприц OMPИ объемом 1 мл с иглой размером 27-G, с резиновым колпачком иглы FM27 и поршнем из резины с покрытием FLUROTEC® 4023/50.

Терапевтическое применение фармацевтических составов.

Фармацевтические составы настоящего изобретения, среди прочего, применяются для лечения, профилактики или смягчения симптомов любого заболевания или нарушения, связанного с активностью PCSK9, в том числе заболеваний или нарушений, опосредованных PCSK9. К примерам неограничивающих заболеваний и нарушений, которые можно излечивать или предупредить посредством введения фармацевтических составов настоящего изобретения, относятся различные дислипидемии, например гиперхолестеринемия, наследственная гиперхолестеринемия, гиперлипидемия, наследственная гиперлипидемия, дисбеталипопротеинемия, наследственная дисбеталипопротеинемия, гипертриглицеридемия и наследственная гипертриглицеридемия.

### Примеры

Приведенные ниже примеры призваны дать специалистам в области полное раскрытие информации и описание того, как следует формулировать и использовать способы и препараты настоящего изобретения, и не призваны ограничивать сферу охвата того, что изобретатели рассматривают как предмет своего изобретения. Были приложены все усилия обеспечить точность в отношении используемых показателей (например, количеств, температуры и пр.), но необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, под частями понимаются части в молях, молекулярным весом называют усредненный молекулярный вес, температура приводится в градусах Цельсия, а давление находится на уровне атмосферного или близко к этому уровню.

Начальные этапы разработки состава включали скрининг органических вспомогательных растворителей, термических стабилизаторов и буферов в жидких и лиофилизированных составах mAb-316P (антител анти-PCSK9 изобретения), чтобы определить вспомогательные вещества, совместимые с белком и повышающие его стабильность, одновременно поддерживая близкую к физиологической осмоляльность и низкую вязкость для внутривенного и подкожного введения. Анализировали также буферные условия, чтобы определить оптимальный pH для максимальной стабильности белка.

Пример 1. Разработка состава анти-PCSK1 mAb-316P.

Проводили скрининг различных буферов, органических вспомогательных растворителей и термических стабилизаторов для выявления вспомогательных веществ, которые повышают стабильность антитела PCSK9. Анализировали также буферные условия, чтобы определить оптимальный pH для максимальной стабильности антитела. Результаты этих исследований использовали для разработки стабильного жидкого состава, а также стабильного лиофилизованного состава, пригодного для клинического использования как при внутривенном (в/в), так и подкожном (п/к) введении. В случае лиофилизованного лекарства был разработан один состав для двойного применения, который можно разводить стерильной водой для инъекций (ВДИ) до концентрации либо 50 мг/мл для в/в или 100 мг/мл для п/к введения. После разведения до 50 мг/мл лекарство можно дополнительно разбавлять в пакете для в/в вливания, содержащем 0,9% хлорида натрия для в/в инъекций. Для жидкого состава концентрации mAb-316P готовили  $175 \pm 27$  и  $150 \pm 23$  мг/мл. В одном осуществлении  $175 \pm 27$  мг/мл mAb-316P готовили в  $10 \pm 1,5$  мМ гистидине (pH  $6,0 \pm 0,3$ ),  $0,01 \pm 0,0015\%$  полисорбате 20,  $5 \pm 0,75\%$  сахарозе. В одном осуществлении  $150 \pm 23$  мг/мл mAb-316P готовили в  $10 \pm 1,5$  мМ гистидине (pH  $6,0 \pm 0,3$ ),  $0,2 \pm 0,03\%$  или  $0,01 \pm 0,0015\%$  полисорбате 20,  $10 \pm 1,5\%$  сахарозе.

Пример 2. Буфер и pH анти-PCSK1 mAb-316P.

Для жидких растворов изучали воздействие pH и типа буфера на стабильность антител PCSK9. 2 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P инкубировали при  $45^\circ\text{C}$  в одном из следующих 10 мМ буферов: ацетатный (pH 5,0-5,5), цитратный (pH 5,5-6,0), сукцинатный (pH 6,0), гистидиновый (pH 6,0), фосфатный (pH 6,0-7,5) или Tris (pH 8,0) для оценки воздействия буфера и pH на термическую стабильность белка (табл. 1). Для этого эксперимента каждый из жидких составов объемом 0,35 мл помещали во флакон емкостью 2 мл из боросиликатного стекла типа 1 с пробкой из бутилкаучука с покрытием FLUROTEC® 4432/50. Общее выделенное количество mAb-316P определяли с использованием обращенно-фазовой хроматографии. Процент нативной формы mAb-316P по сравнению с агрегированной определяли с помощью

экслюзивной хроматографии. Процент кислых и основных форм mAb-316P определяли с помощью катионообменной хроматографии. Максимальную стабильность белка отслеживали по данным экслюзивной хроматографии (ЭХ) и катионообменной хроматографии (КОХ) для состава анти-PCSK9 mAb-316P в 10 мМ гистидиновом буфере при pH 6,0.

Оптимальный pH для mAb-316P затем определяли инкубированием 10 мг/мл mAb-316P при 45°C в гистидиновом буфере в интервале от pH 5,5 до pH 6,5. Максимальную стабильность белка отслеживали по ЭХ и КОХ для составов mAb-316P в гистидиновом буфере при pH 6,0 (табл. 2). Результаты проведенных анализов показали, что основные пути распада белка связаны с образованием агрегатов, продуктов разложения и различных зарядовых форм. На основании полученных результатов для подготовки жидких и лиофилизированных составов mAb-316P выбрали 10 мМ гистидиновый буфер при pH 6,0.

Результаты исследований вариантов состава показывают, что в основных условиях (pH $\geq$ 6,5) анти-PCSK9 mAb-316P в растворе может подвергаться деамидированию. Напротив, при pH $\leq$ 5,5 наблюдалась повышенная скорость образования вариантов молекулярного веса mAb-316P. На основании этих данных pH буфера, используемого для состава mAb-316P, поддерживается в интервале между pH 5,7 и pH 6,3. Для ускоренных исследований стабильности mAb-316P в этом интервале pH получены аналогичные результаты.

Пример 3. Выбор средств защиты от стресса при встряхивании.

Раздельно изучали различные вспомогательные растворители по их способности сводить к минимуму образование частиц в смесях, содержащих mAb-316P из-за стресса при встряхивании. Анализ мутности лекарственного препарата при встряхивании показал увеличение оптической плотности (OD) при 405 нм после 120 мин встряхивания раствора, содержащего mAb-316P (0,35 мл 25 мг/мл раствора mAb-316P, 10 мМ гистидина, pH 6,0 $\pm$ 0,2 во флаконе из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с пробкой из бутылкаучука с покрытием FLUROTEC® 4432/50) (табл. 3). Состав со всеми изученными вспомогательными растворителями препятствовал повышению мутности из-за встряхивания. При этом 20% PEG 300, 10% PEG 300 и 20% пропиленгликоля значительно снижали термическую стабильность mAb-316P по данным ЭХ (табл. 4; та же концентрация mAb-316P, буфер и емкость, что и в приведенном выше исследовании встряхивания). Составы с полисорбатом 20, полисорбатом 80, Pluronic F68 и PEG 3350 по результатам ЭХ и КОХ не оказывали заметного эффекта на термическую стабильность mAb-316P, что делает указанные вспомогательные растворители пригодными для использования в составах анти-PCSK9 mAb-316P. Полисорбат 20 выбирали в качестве органического вспомогательного растворителя для подготовки лиофилизированных и жидких составов mAb-316P, поскольку при этом удавалось обеспечить высокие характеристики стабильности при встряхивании и исследовании термической стабильности mAb-316P.

Пример 4. Выбор средств защиты от термического стресса.

Раздельно анализировали различные вспомогательные вещества, которые выбирали из перечня, включающего сахара, аминокислоты и неорганические соли, для оптимального увеличения термической стабильности mAb-316P. Итоговая информация по некоторым термическим стабилизаторам, которые включали в исследование, приводится в табл. 5. Для этих экспериментов вспомогательные "термические стабилизаторы" добавляли в раствор 20 мг/мл mAb-316P в 10 мМ гистидине (0,35 мл во флаконе из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с пробкой из бутылкаучука с покрытием FLUROTEC® 4432/50). По результатам ЭХ анализа составы, содержащие сахарозу, сорбитол, маннитол и трегалозу, демонстрировали наименьшую степень распада mAb-316P. При этом в составах с сорбитолом наблюдалось неожиданное увеличение мутности по сравнению с составами, содержащими сахарозу, трегалозу и маннитол (табл. 5). Несмотря на то что для сахарозы, трегалозы и маннитола не наблюдалось никакого воздействия на образование различных зарядовых форм анти-PCSK9 mAb-316P, оказалось, что маннитол дестабилизирует белок в ходе нескольких циклов замораживания-оттаивания. Таким образом, стабильность mAb-316P в составах с сахарозой и трегалозой была приблизительно одинаковой.

Пример 5. Лиофилизированный состав.

Был разработан лиофилизированный состав для повышения стабильности анти-PCSK9 mAb-316P, в частности, по отношению к различным зарядовым формам, и для увеличения максимальных доставляемых концентраций mAb-316P. Различные лиопротекторы добавляли к 0,7 мл 50 мг/мл раствора mAb-316P, 10 мМ гистидина во флаконе из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с пробкой из бутылкаучука с покрытием FLUROTEC® 4432/50, лиофилизировали и анализировали их способность стабилизировать лиофилизированный mAb-316P при инкубации при 50°C. Перед анализом лиофилизированный остаток разводили до 100 мг/мл mAb-316P. Два лиофилизированных состава с наибольшей стабильностью по данным ЭХ и КОХ содержали 1) 6% сахарозы или 2) 2% сахарозы и 2% аргинина. Для приготовления лекарственного препарата mAb-316P выбрали 6% сахарозы. Таким образом, лиофилизированный лекарственный препарат на основе анти-PCSK9 mAb-316P получали лиофилизацией оптимизированного забуференного водного раствора препарата, содержащего 10 мМ гистидина, pH 6,0 $\pm$ 0,1, 0,1% (вес./об.) полисорбата 20, 6% (вес./об.) сахарозы и 50 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P. Результаты анализа стабильности такого лиофилизированного препарата при хранении и стрессе приводятся в табл. 7.

Цикл лиофилизации анти-PCSK9 mAb-316P формировали на основе измеряемой  $T_g'$  состава (температура низкотемпературного стеклования), которую определяли с помощью модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии при пониженной температуре окружающей среды (мДСК). При первоначальной сушке температура продукта не должна подниматься выше  $T_g'$ , которая по результатам измерений составляет  $-27,9^{\circ}\text{C}$ .

Для получения лиофилизованного препарата mAb-316P во флаконы из стекла типа 1 помещали 5,3 мл 50 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина (рН 6,0), 0,1% полисорбата 20, 6% сахарозы и проводили лиофилизацию в следующей последовательности:

1. Температура препарата в процессе загрузки: 5-25°C
2. Начальное выдерживание: 60 минут при 5°C
3. Скорость (время) замораживания: 0,5°C/мин (100 минут)
4. Выдерживание: 120 минут при -45°C
5. Установка вакуума: 100 мТорр
6. Скорость (время) нагревания для первичной сушки: 0,5°C/мин (40 минут)
7. Температура препарата при первичной сушке: -25°C
8. Продолжительность первичной сушки: 78 часов
9. Скорость (время) нагревания для вторичной сушки: 0,2°C/мин (300 минут)
10. Температура препарата при вторичной сушке: 35°C
11. Продолжительность вторичной сушки: 6 часов
12. Скорость (время) охлаждения: 0,5°C/мин (20 минут)
13. Выдерживание: 60 минут при 25°C\*
14. Заполнение газообразным азотом
15. Укупорка под вакуумом: 80% атмосферного давления (608 000 мТорр)

Если после вторичной сушки и до момента укупорки требуется продолжительное хранение, температура в лиофилизаторах устанавливается на уровне  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Лيوфилизированный лекарственный препарат, который был получен в ходе описанных выше завершающих циклов, имел хороший внешний вид, низкое содержание влаги (0,3%), время растворения меньше 4 мин без признаков мутности разведенного раствора.

Внешний вид лиофилизованного остатка не менялся, если лекарственный препарат mAb-316P (mAb-316P DP) выдерживали 2 месяца при  $50^{\circ}\text{C}$  или хранили 3 месяца при  $5^{\circ}\text{C}$ . Не отмечалось воздействия на рН, внешний вид или мутность разведенного лекарственного препарата mAb-316P и не отмечалось особых различий в количествах выделенного mAb-316P. Через 2 месяца после инкубации при  $50^{\circ}\text{C}$  лиофилизированный лекарственный препарат mAb-316P был на 1,1% более разложившимся по данным ЭХ ВЭЖХ и на 8,3% более разложившимся по данным КОХ ВЭЖХ. Не отмечалось заметного разложения лиофилизованного лекарственного препарата mAb-316P при хранении в течение 3 месяцев при  $5^{\circ}\text{C}$ . Для всех подвергшихся стрессовому воздействию образцов не отмечалось заметного снижения биологической активности по результатам биопроб анти-PCSK9.

Пример 6. Жидкие и восстановленные препараты mAb-316P.

Существует два метода восстановления лиофилизованного лекарственного препарата mAb-316P в зависимости от способа введения. Для в/в введения лекарственный препарат mAb-316P разводят 5,0 мл стерильной ВДИ с образованием 5,3 мл раствора, содержащего 50 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 0,1% (вес./об.) полисорбата 20 и 6% (вес./об.) сахарозы. Для п/к введения лекарственный препарат mAb-316P разводят 2,3 мл стерильной ВДИ с образованием 2,7 мл раствора, содержащего 100 мг/мл REGN727, 20 мМ гистидина, рН 6,0, 0,2% (вес./об.) полисорбата 20 и 12% (вес./об.) сахарозы. Доступный для отбора объем составляет 4,8 мл для в/в и 2,0 мл для п/к введения; остаток разведенного раствора 0,7 мл оставляют во флаконе для п/к.

В альтернативном варианте жидкий mAb-316P готовят в виде жидкого препарата без промежуточного этапа лиофилизации. Жидкие препараты mAb-316P имеют концентрацию 150 мг/мл ( $\pm 15\%$ ) или 175 мг/мл ( $\pm 15\%$ ) анти-PCSK9 mAb-316P в  $10 \pm 1,5$  мМ гистидине (рН  $6,0 \pm 0,3$ ), полисорбате 20 при  $0,01 \pm 0,0015\%$  или  $0,2 \pm 0,03\%$ , сахарозы при  $5 \pm 0,75\%$  или  $10 \pm 1,5\%$ , а также в случае состава 175 мг/мл - аргинин при  $50 \pm 7,5$  мМ.

Анти-PCSK9 mAb-316P оказался стабильным при стерильном фильтровании. Для приготовления клинических препаратов использовали фильтрационную установку Millipore MILLIPAK, а для исследований применяли фильтр аналогичного состава (Millipore MILLEX DURAPORE). По сравнению с хранением в стеклянном флаконе стабильность состава лекарственного препарата mAb-316P (mAb-316P FDS) менялась незначительно при хранении в полипропиленовой пробирке, полистирольной пробирке, поликарбонатной пробирке или в стеклянном флаконе со стальным шариковым клапаном (табл. 8).

Пример 7. Жидкие препараты в предварительно заполненных шприцах.

Исследования по разработке состава проводили с целью приготовления высококонцентрированных жидких составов mAb-316P, которые могут использоваться в предварительно заполненных шприцах (PFS) для п/к введения. Результаты, полученные на стадии разработки лиофилизованного препарата REGN727, продемонстрировали, что оптимальным буфером, pH, вспомогательным растворителем и термическим стабилизатором являлись гистидин, pH 6,0, полисорбат 20 и сахароза соответственно (см. выше). Эти же вспомогательные вещества использовались для разработки составов лекарственных препаратов в концентрации 150 и 175 мг/мл mAb-316P. Для снижения вязкости состава к лекарственному препарату в концентрации 175 мг/мл mAb-316P добавляли аргинин. Стабильность при стрессовом воздействии лекарственного препарата 150 и 175 мг/мл mAb-316P изучали в длинных стеклянных шприцах Nuova OMPi емкостью 1 мл с предварительным заполнением (PFS) и сравнивали со стабильностью лекарственного препарата 150 и 175 мг/мл в контрольных стеклянных флаконах. После инкубирования лекарственного препарата 150 или 175 мг/мл mAb-316P при 45°C не наблюдалось различий в физической или химической деградации между OMPi PFS и контрольным стеклянным флаконом. Полученные данные показывают, что составы лекарственных препаратов 150 и 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P достаточно стабильны для использования в PFS.

Пример 8. Стабильность составов лекарственных препаратов mAb-316P.

Исследования стабильности проводили для выяснения стабильности при хранении и воздействии стрессовых условий составов 150 и 175 мг/мл mAb-316P. Для оценки физической стабильности mAb-316P использовали анализ мутности и ОФ ВЭЖХ. Физическая стабильность определяется как восстановление растворимых форм анти-PCSK9 mAb-316P в растворе. Потеря белка может быть связана с осаждением белка или поверхностной адсорбцией. Наличие частиц в растворе можно регистрировать визуально или по измерениям оптической плотности (OD) на 405 нм (измерения мутности). В последнем анализе увеличение OD указывает на повышение мутности из-за образования твердых частиц. Присутствие твердых частиц, регистрируемое по измерениям OD, свидетельствует о том, что образец не в состоянии оставаться стабильным. Восстановление mAb-316P регистрируется с помощью ОФ ВЭЖХ. При анализе ОФ ВЭЖХ антитело анти-PCSK9 mAb-316P элюируется из обращенно-фазовой колонки одним пиком. Концентрация каждого испытываемого образца определялась по площади элюируемого пика антитела mAb-316P по сравнению с данными калибровочной кривой, построенной с использованием стандартов mAb-316P с фиксированной нагрузкой белка.

Химическая стабильность определяется по сохранению химической структуры антитела анти-PCSK9 (mAb-316P) в образце. Химическая нестабильность в значительной мере может быть отнесена к образованию ковалентно модифицированных форм белка (например, ковалентных агрегатов, продуктов распада или различных заряженных форм), а также нековалентно модифицированных форм белка (например, нековалентных агрегатов). К настоящему времени единственными зарегистрированными продуктами распада mAb-316P были соединения, которые отличаются либо по молекулярному весу, либо по заряду. Продукты распада с более высоким и более низким молекулярным весом можно отделить от нативного mAb-316P с помощью ЭХ ВЭЖХ. Процент нативного mAb-316P в эксклюзионном хроматографическом методе определяется отношением площади нативного пика к суммарной площади всех пиков антитела mAb-316P.

Различные заряженные формы mAb-316P отделяют от нативного mAb-316P с помощью катионообменной хроматографии. Пики, которые элюируются с колонки КОХ ВЭЖХ с временами удерживания до главного пика, маркируются как "кислые пики", а те, которые элюируются с колонки КОХ ВЭЖХ со временами удерживания после главного пика, маркируются как "основные пики". Процент распавшегося mAb-316P в катионообменном хроматографическом методе определяется изменением относительного процента площадей главного, кислого и основного пиков по сравнению с суммарной площадью всех пиков mAb-316P.

Оценка mAb-316P в условиях ускоренного исследования стабильности проводилась в рамках воздействия на антитело различных факторов стресса. В таких тестах используются экстремальные условия обращения, в которых состав лекарственного препарата может оказаться в процессе производства лекарства.

Состав лекарственного препарата mAb-316P помещали в поликарбонатные флаконы емкостью 5 мл для встряхивания, циклов замораживания/оттаивания и моделирования условий хранения в замороженном состоянии. Для исследования стрессовой стабильности при высоких температурах составы лекарственных препаратов mAb-316P помещали в стеклянные флаконы.

Пример 9. Исследования стабильности составов лекарственных препаратов (FDS) при хранении.

Состав лекарственного препарата 150 мг/мл mAb-316P (FDS; 0,5 мл в 5 мл поликарбонатном флаконе; 150 мг/мл антитела mAb-316P, 10 mM гистидин (pH 6,0), 0,2% полисорбат 20 и 10% сахарозы) оказался физически и химически стабильным при хранении при  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  в течение 12 месяцев. По данным эксклюзионной и ионообменной хроматографии не обнаруживалось заметных потерь mAb-316P и заметной химической деградации антитела. Более 97% восстановленного mAb-316P было в "нативной" структуре, как показали результаты эксклюзионной хроматографии, и более 56% восстановленного mAb-316P

было в "главной заряженной форме", как показали результаты катионообменной хроматографии. Результаты приводятся в табл. 9.

Состав лекарственного препарата 175 мг/мл mAb-316P (FDS; 0,75 мл в 5 мл поликарбонатном флаконе; 175 мг/мл антитела mAb-316P, 10 мМ гистидин (pH 6,0), 0,01% полисорбат 20 и 5% сахарозы) оказался физически и химически стабильным при хранении при  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  в течение 3 месяцев. По данным эксклюзионной и ионообменной хроматографии не обнаруживалось заметных потерь mAb-316P и заметной химической деградации антитела. Более 96% восстановленного mAb-316P было в "нативной" структуре, как показали результаты эксклюзионной хроматографии, и более 56% восстановленного mAb-316P было в "главной заряженной форме", как показали результаты катионообменной хроматографии. Результаты приводятся в табл. 10.

Пример 10. Исследования стабильности составов лекарственных препаратов при стрессовом воздействии.

Исследования стабильности при стрессовом воздействии проводили для состава лекарственного препарата 150 мг/мл mAb-316P (FDS) (0,35-0,5 мл 150 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина (pH 6,0), 0,2% полисорбата 20, 10% сахарозы) и состава лекарственного препарата 175 мг/мл mAb-316P (0,5-1,7 мл 175 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидина (pH 6,0), 0,01% полисорбата 20, 5% сахарозы, 50 мМ аргинина). Исследования при высокой температуре проводили во флаконах из боросиликатного стекла типа 1 емкостью 2 мл с бутылкаучуковой пробкой с покрытием FLUROTREC® 4432/50; остальные исследования проводили в поликарбонатных флаконах емкостью 5 мл. Составы лекарственных препаратов 150 и 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P оказались физически и химически стабильными при встряхивании в течение двух часов. Раствор оставался визуально прозрачным, не отмечались потери белка и не образовывались соединения с другим молекулярным весом или различные заряженные формы (табл. 11 и 12). mAb-316P также оказалось физически и химически стабильным после восьми циклов замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$  и оттаивания до комнатной температуры. После восьми циклов замораживания/оттаивания раствор белка оставался на вид прозрачным, и потери белка не регистрировались. Анализ с помощью ЭХ или КОХ не выявил образования соединений с другим молекулярным весом (растворимые агрегаты или продукты распада) или различных заряженных форм соответственно.

Несмотря на то что составы лекарственных препаратов 150 и 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P были физически стабильными при инкубировании при 37 или  $45^{\circ}\text{C}$  в течение 28 дней, тем не менее наблюдалась определенная доля химического распада (табл. 11 и 12). Результаты испытаний в условиях стрессового воздействия показали, что основные пути распада связаны с образованием агрегатов, продуктов разложения и различных зарядовых форм.

Как и ожидалось, скорость распада антитела анти-PCSK9 mAb-316P была медленнее при  $37^{\circ}\text{C}$ , чем при  $45^{\circ}\text{C}$ . Не отмечалось заметных изменений физической или химической стабильности составов лекарственных препаратов 150 или 175 мг/мл mAb-316P при инкубировании в течение 28 дней при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ .

Пример 11. Стабильность при хранении лекарственного препарата (DP).

В лекарственном препарате 150 мг/мл mAb-316P содержится 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,01% полисорбата 20, 10% сахарозы и 150 мг/мл антитела анти-PCSK9 mAb-316P. В лекарственном препарате 175 мг/мл mAb-316P содержится 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,01% полисорбата 20, 5% сахарозы, 50 мМ аргинина и 175 мг/мл антитела анти-PCSK9 mAb-316P. Не отмечалось никаких изменений в физической и химической стабильности лекарственного препарата 150 или 175 мг/мл mAb-316P (DP) при хранении при  $5^{\circ}\text{C}$  в течение 6 месяцев в предварительно заполненном шприце (PFS; длинный стеклянный шприц OMP1 емкостью 1 мл с тонкостенной иглой размера 27 и резиновым защитным колпачком иглы FM27 с резиновым поршнем с покрытием FLUROTREC® 4023/50) (табл. 13 и 14). Растворы сохраняли визуальную прозрачность, не наблюдались потери белка, и после воздействия перечисленных факторов стресса не отмечалось никаких изменений pH. Кроме того, не регистрировалось существенных изменений в соединениях с различным молекулярным весом или различных зарядовых формах по данным ЭХ и КОХ соответственно.

Пример 12. Стабильность лекарственного препарата (DP) при стрессовом воздействии.

Стабильность лекарственных препаратов 150 и 175 мг/мл mAb-316P анализировали при инкубировании предварительно заполненных шприцов при 25 и  $45^{\circ}\text{C}$ . Каждый из соответствующих лекарственных препаратов был физически стабильным при инкубировании в течение 28 дней при  $45^{\circ}\text{C}$  или в течение 6 месяцев при  $25^{\circ}\text{C}$  (табл. 13 и 14). Растворы сохраняли визуальную прозрачность, не наблюдались потери белка, и после воздействия перечисленных факторов стресса не отмечалось никаких изменений pH. При этом агрегаты и различные заряженные формы регистрировались при инкубировании белка при 45 и  $25^{\circ}\text{C}$ . Такие стрессовые испытания показывают, что эти пути разложения лекарственного препарата являются основными. Для лекарственного препарата 150 мг/мл доля агрегатов mAb-316P после инкубирования в течение 28 дней при  $45^{\circ}\text{C}$  увеличилась на 1,9%, а доля кислых форм возросла на 19,1%. Снижение уровня химического распада отмечалось при инкубировании белка при  $25^{\circ}\text{C}$ . Отмечалось увеличение относительного количества агрегатов на 0,8%, а кислых форм - на 10,3% через 6 месяцев инкуби-



рования при 25°C. Для лекарственного препарата 175 мг/мл доля агрегатов mAb-316P после инкубирования в течение 28 дней при 45°C увеличилась на 1,8%, а доля кислых форм возросла на 17,0%. Снижение уровня химического распада отмечалось при инкубировании белка при 25°C. Отмечалось увеличение относительного количества агрегатов на 0,7%, а кислых форм - на 9,4% через 6 месяцев инкубирования при 25°C. Для обоих лекарственных препаратов 150 и 175 мг/мл доля агрегатов не отмечалось значительных изменений стабильности mAb-316P после инкубирования в течение 1 месяца при 25°C.

Пример 13. Объемы заполнения.

Вводимый объем предварительно заполненного шприца (PFS), содержащего 150 мг/мл лекарственного препарата REGN727, составляет 1,0 мл. Вводимый объем PFS, содержащего 175 мг/мл лекарственного препарата REGN727, составляет 1,14 мл. Ни в один из PFS не включались излишки, поскольку мертвый объем шприца пренебрежимо мал (от 0,005 до 0,01 мл).

Пример 14. Стабильность mAb-316P при хранении в различных материалах.

Анти-PCSK9 mAb-316P оказался стабильным при стерильном фильтровании. Для исследования и для приготовления клинических препаратов использовали фильтрационную установку MILLIPORE MILLIPAK. По сравнению с хранением в стеклянных флаконах стабильность составов 150 и 175 мг/мл лекарственного препарата mAb-316P менялась незначительно при хранении в полипропиленовой пробирке, полистирольной пробирке, поликарбонатной пробирке или в стеклянном флаконе с кольцом из нержавеющей стали (табл. 15 и 16). Несмотря на наблюдаемый распад при инкубировании состава лекарственного препарата при 40°C в течение 14 дней, не наблюдалось существенных различий по степени разложения mAb-316P между контролем, стеклянным флаконом и воздействием пластиковых контейнеров и нержавеющей стали.

Пример 15. Анализ антитела анти-PCSK9 mAb-316P.

По крайней мере две партии mAb-316P (партия 1 и партия 2) анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии и лазерного светового рассеяния с кратными углами (ЭХ ЛСРКУ) - аналитического метода, который позволяет оценить молярную массу белка или гликопротеина. Партии 1 и 2 имели соответствующие молярные массы 154,5 и 154,6 кДа. В других партиях молярные массы находились в диапазоне от 154,4 до 154,8 кДа (среднее примерно 155 кДа) для главного пика, который элюировался с носителя ЭХ. На такой главный пик приходилось примерно 96,7-99,2% суммарной площади пика белка, и это соответствует интактному мономеру mAb-316P (то есть "нативному" в соответствии с терминологией настоящего документа).

mAb-316P анализировали капиллярным изоэлектрическим фокусированием (КИЭФ), чтобы определить изоэлектрические точки главных составляющих изоформ.  $pI$  и средняя площадь пика (% от суммарной площади пиков) для образцов mAb-316P по данным КИЭФ приведены в табл. 17. В каждой партии присутствовал главный пик (пик 5) с расчетным  $pI$  примерно 8,5, который присутствовал в концентрациях 66,4 и 68,0% в партиях 1 и 2 соответственно. Преобладающая форма (пик 5) с наибольшей вероятностью представляет собой интактное полностью гликозилированное антитело без C-терминального лизина (то есть "главную заряженную форму" в соответствии с терминологией настоящего документа).

Масс-спектрометрический (МС) анализ восстановленных триптических пептидных карт mAb-316P для партии 1 и партии 2 позволил подтвердить наличие единственного сайта гликозилирования, Asn298, в домене Fc обеих партий. Основные ковалентно связанные гликановые формы этого сайта гликозилирования приводятся в табл. 18. В целом, было установлено, что обе партии содержат сложные 2-антенарные гликаны, большинство которых фукозилированы при Asn298. При этом относительное количество фукозилированного агалактозила (G0), содержащего сахарные цепочки, в партии 2 было несколько больше по сравнению с количеством такой гликоформы в партии 1. Напротив, относительные количества фукозилированного дигалактозила (G2) и фукозилированного моногалактозила (G1), содержащие сахарные цепочки в партии 2, меньше по сравнению с относительными количествами таких сахарных цепочечных структур в партии 1. Анализ результатов ЖХ/МС двух образцов лекарственных препаратов (пик 16) также позволил выявить 2,9 и 8,4% пептида тяжелой цепи без сайта гликана при Asn298 в партии 1 и партии 2 соответственно.

Анализовались профили гликана, полученные с помощью ВЭЖХ после высвобождения олигосахаридов из каждой из двух партий mAb-316P. В каждой хроматограмме производные олигосахаридов подразделялись на две главные группы: нефукозилированные 2-антенарные формы и фукозилированные 2-антенарные формы. В каждой группе (фукозилированные и нефукозилированные) олигосахариды дополнительно разбивали на дигалактозилные (G2), моногалактозилные (G1) и агалактозилные (G0) формы. Структурные отнесения в олигосахаридах были получены с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией. Интегрирование каждого пика в двух хроматограммах показало, что уровень фукозилирования в двух партиях mAb-316P был в целом достаточно высоким, при этом в партиях 1 и 2 отмечалось 80,0 и 86,9% фукозилирования.

Несмотря на близкий совокупный процент фукозилирования двух партий, отмечались количественные различия в относительном содержании каждой из гликановых форм, присутствующих в двух партиях (табл. 19). В партии 1 для фукозилированных гликановых структур G0, G1 и G2 регистрировали процент площадей пиков 34,4, 39,6 и 11,7% соответственно. Напротив, процент площадей пиков в партии 2

составлял 45,8, 33,3 и 7,1% для фукозилированных гликоформных структур G0, G1 и G2 соответственно, указывая на различия в степени галактозилирования между двумя партиями. Пик гликана с высоким содержанием маннозы (гликан man5) (пик 2) регистрировался с относительным содержанием 1,8-2,9% по сравнению с общим количеством сахарной цепочки, регистрируемой в обеих партиях (табл. 19). Всего девять неидентифицированных пиков с процентным соотношением площадей пиков от 0,5 до 1,5% также регистрировалось в обеих партиях, проанализированных таким методом, и они составляют  $\leq 3\%$  суммарной площади гликановых пиков, выявленных в каждой партии. Анализ эквимольной смеси двух партий не выявил новых пиков, и процентная доля площадей для всех пиков в смеси хорошо коррелировала с ожидаемыми значениями по результатам раздельного анализа каждой партии (табл. 19).

Таблица 1

Влияние буфера и pH на стабильность mAb-316P  
при 45°C в течение 28 дней

pH/буфер	Мутность <sup>1</sup>	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации <sup>2</sup>	0,00	1,8	98,1	0,3	57,0	33,0	10,0
pH 8,0, Tris	0,00	1,7	88,9	0,8	15,2	82,4	2,4
pH 8,0, фосфат	0,01	2,0	89,4	1,3	н.д.	н.д.	н.д.
pH 7,5, фосфат	0,01	1,9	91,7	0,9	н.д.	н.д.	н.д.
pH 7,0, фосфат	0,01	2,1	92,4	0,7	16,7	78,8	4,5
pH 6,5, фосфат	0,00	2,0	93,2	0,6	25,0	68,3	6,6
pH 6,0, фосфат	0,00	1,8	93,9	0,3	29,8	62,3	8,0
pH 6,0, гистидин	0,00	1,9	94,5	0,0	36,9	54,0	9,1
pH 6,0, сукцинат	0,00	1,9	93,1	0,4	31,9	59,8	8,3
pH 6,0, цитрат	0,00	1,9	95,1	0,4	32,1	58,1	9,9
pH 5,5, цитрат	0,00	2,1	94,6	0,4	28,0	62,0	9,9
pH 5,5, ацетат	0,00	2,0	92,4	0,2	34,5	56,9	8,5
pH 5,0, ацетат	0,00	1,8	93,0	0,2	31,1	57,5	11,4

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>2</sup> - средние значения неинкубированных образцов для всех 12 составов.

Таблица 2

Влияние pH на 10 мг/мл mAb-316P,  
10 мМ гистидин при 45°C в течение 28 дней

pH/буфер	Мутность <sup>1</sup>	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации <sup>2</sup>	0,00	9,5	98,1	0,2	57,8	31,1	11,1
pH 5,5	0,01	9,5	94,3	0,5	34,7	52,2	13,1
pH 6,0	0,01	9,7	94,7	0,9	37,5	51,8	10,6
pH 6,5	0,01	10,1	93,4	1,8	35,7	55,2	9,1

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>2</sup> - средние значения неинкубированных образцов для всех 3 составов.

Таблица 3

Влияние вспомогательных растворителей на 25 мг/мл  
mAb-316P при встряхивании в течение 120 мин

Органический вспомогательный растворитель	Мутность <sup>1</sup>	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
Без встряхивания <sup>2</sup>	0,00	25,6	97,3	0,5	50,6	39,2	10,3
Без вспомогательного	0,10	25,6	97,3	0,5	51,1	39,0	9,9

растворителя							
0,2% полисорбата 20	0,01	24,7	97,2	0,5	51,1	38,9	10,1
0,2% полисорбата 80	0,01	24,7	97,3	0,5	50,9	38,9	10,2
0,2% Pluronic F68	0,01	25,2	96,9	0,5	50,5	39,2	10,3
3% PEG 3350	0,01	25,3	97,1	0,5	50,7	39,0	10,2
1,5% PEG 3350	0,01	24,9	97,1	0,5	50,8	39,1	10,1
20% PEG 300	0,00	26,7	97,0	0,6	48,8	40,5	10,7
10% PEG 300	0,01	25,7	97,2	0,5	49,9	39,8	10,3
20% пропиленгликоля	0,01	25,8	96,9	0,5	51,1	38,6	10,3

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>2</sup> - средние значения образцов без встряхивания для всех 9 составов.

Таблица 4  
Влияние вспомогательных растворителей на 25 мг/мл mAb-316P, инкубированного при 45°C в течение 28 дней

Органический вспомогательный растворитель	Мутность <sup>1</sup>	pH	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации <sup>2</sup>	0,00	6,1	25,6	97,3	0,5	50,6	39,2	10,3
Без вспомогательного растворителя	0,02	6,2	24,9	94,5	0,7	34,8	54,7	10,5
0,2% полисорбата 20	0,03	6,2	24,3	94,6	0,5	35,2	54,3	10,5
0,2% полисорбата 80	0,02	6,2	24,3	94,8	0,6	35,1	54,5	10,4
0,2% Pluronic F68	0,03	6,1	24,6	94,7	0,6	33,8	55,6	10,6
3% PEG 3350	0,03	6,2	24,8	95,0	0,7	35,9	53,5	10,6
1,5% PEG 3350	0,02	6,2	24,4	94,8	0,6	36,0	53,5	10,5
20% PEG 300	0,12	4,8	25,4	88,8	4,2	н.д.	н.д.	н.д.
10% PEG 300	0,09	5,4	25,0	93,7	0,9	24,1	67,0	8,9
20% пропиленглик	0,03	6,1	24,6	89,9	5,6	34,6	54,2	11,2
оля								

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>2</sup> - средние значения образцов без встряхивания для всех 9 составов.

Таблица 5  
Влияние стабилизатора на 20 мг/мл mAb-316P, 10 мМ гистидин при 45°C в течение 28 дней

Вспомогательное вещество	Визуально	Мутность <sup>1</sup>	pH	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
Без инкубации <sup>2</sup>	Годен	0,00	6,0	20,2	97,7	0,5	51,1	39,3	9,6
Без стабилизатора	Годен	0,02	6,1	19,8	93,6	2,0	33,5	56,5	10,1
150 мМ NaCl	Негоден	0,03	6,0	20,0	91,0	4,6	35,3	51,0	13,6
20% сахарозы	Годен	0,04	6,0	22,6	94,4	1,0	32,1	57,0	10,9
20% сорбитола	Годен	0,16	5,8	21,8	94,3	1,0	23,5	67,4	9,1
10% маннитола	Годен	0,02	6,0	21,2	94,8	0,9	34,4	54,5	11,1
20% трегалозы	Годен	0,05	6,0	22,7	94,7	0,5	33,2	56,6	10,2
5% глицерина	Годен	0,10	5,9	20,8	90,2	5,4	н.д.	н.д.	н.д.
3% аргинина	Годен	0,02	6,1	21,1	92,9	3,0	37,5	49,2	13,3
3% глицина	Годен	0,03	6,1	19,8	93,7	1,7	31,0	58,0	10,9

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>2</sup> - средние значения неинкубированных образцов для всех 9 составов.

Таблица 6  
Влияние лиопротекторов на лиофилизированный mAb-316P,  
инкубированный при 50°C в течение 28 дней

Вспомогательное вещество	Визуально	Мутность <sup>1</sup>	pH	Всего (мг/мл)	% нативного	% агр.	% главная	% кислая	% основная
без инкубации	Годе	0,00	6,0	100	97,1	1,2	51,0	38,3	10,7
Без лиопротектора	Негоден	0,09	6,1	100	70,0	28,5	24,2	35,1	40,7
2% сахарозы	Годе	0,02	6,1	104	90,7	7,4	37,4	39,1	23,6
6% сахарозы	Годе	0,00	6,1	105	96,1	1,8	46,8	39,2	14,1
2% сахар., 2% Gly	Годе	0,02	6,0	114	94,5	3,4	40,9	42,4	16,8
2% сахар., 2% Arg	Годе	0,00	5,9	109	95,9	2,0	47,2	38,4	14,4

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>2</sup> - лиофилизированный лекарственный препарат, разведенный до 100 мг/мл REGN727 до анализа;

<sup>3</sup> - средние значения для исходного материала 4 составов.

Таблица 7  
Стабильность лиофилизованного лекарственного  
препарата, разведенного до 100 мг/мл

Температура хранения	Без хранения	5°C 4 мес.	25°C 3 мес.	40°C 3 мес.	50°C 2 мес.
Мутность <sup>1</sup>	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02
pH	6,2	6,3	6,2	6,2	6,2
% суммарного выделения	100	104	100	98	105
% нативного	96,0	96,5	96,2	95,7	94,9
% агрегата	1,7	1,4	1,7	2,4	2,9
% главная	50,6	51,5	49,2	46,2	43,5
% кислая	38,0	37,9	38,2	39,5	40,1
% основная	11,4	10,5	12,7	14,3	16,2
Биопроба (% этал. станд.) <sup>2</sup>	146	НП	НП	НП	152

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>2</sup> - критерии приемлемости: 50-200% от эталонного стандарта.

Таблица 8  
Совместимость 50 мг/мл mAb-316P после 14 дней  
при 40°C и влажности 75%

Хранение	Без хранения	Стекло	Полипропилен	Полистирол	Поликарбонат	Нержавеющая сталь
Мутность <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
% суммы	100	98	99	104	103	98
% нативного	97,0	96,3	96,3	96,2	96,2	96,1
% агрегата	2,0	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0
% главная	50,8	45,7	44,9	45,2	45,6	45,5
% кислая	38,1	42,8	43,6	43,0	42,5	43,2
% основная	11,2	11,5	11,6	11,9	11,8	11,2

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 9  
Стабильность 150 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P  
в течение 12 месяцев при -80°C

Температура хранения	Контроль	-80°C	-30°C	-20°C
Мутность (OD 405 нм)	0,00	0,00	0,01	0,01
% общего выделения mAb-316P	100	104	108	111
% выделения нативного	97,5	97,3	97,2	97,2
% выделения агрегатов	1,7	1,8	1,8	1,9
% выделения главной	56,2	56,5	56,4	56,3
% выделения кислой	26,5	25,7	25,7	25,4
% выделения основной	17,4	17,9	17,9	18,2

Таблица 10  
 Стабильность 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P  
 в течение 3 месяцев при -80°C

Температура хранения	Контроль	-80°C	-30°C	-20°C
Мутность (OD 405 нм) <sup>1</sup>	0,00	0,01	0,01	0,01
% общего выделения REGN727 (ОФ ВЭЖХ)	100	100	104	101
% выделения нативного REGN727 (ЭХ ВЭЖХ)	96,2	96,5	96,4	96,3
% выделения агрегированного REGN727 (ЭХ ВЭЖХ)	2,7	2,5	2,6	2,7
% выделения главной REGN727 (КОХ ВЭЖХ)	58,5	56,2	56,6	56,7
% выделения кислой REGN727 (КОХ ВЭЖХ)	29,4	29,4	29,4	29,4
% выделения основной REGN727 (КОХ ВЭЖХ)	12,2	14,5	14,0	13,9

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 11  
 Стабильность 150 мг/мл mAb-316P FDS<sup>1</sup>  
 при стрессовом воздействии

Стресс-тест	Без стресса <sup>2</sup>	Встряхивание		45°C инкубирование		37°C инкубирование		25°C инкубирование		Замор /оттаив.
		60 мин	120 мин	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	
Время воздействия	0 мин	60 мин	120 мин	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	8 циклов
Внешний вид	Годеен	Годеен	Годеен	Годеен	Годеен	Годеен	Годеен	Годеен	Годеен	Годеен
Мутность <sup>3</sup>	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
% суммарного выделения	100	101	102	98	98	99	98	100	99	101
% выделения нативного	97,4	97,5	97,2	94,2	92,4	95,7	95,1	96,7	96,2	97,1
% выделения агрегатов	1,6	1,7	2,1	3,4	4,1	2,4	2,6	2,0	2,2	1,7
% выделения главной	53,6	53,7	54,7	38,7	29,0	46,3	39,5	51,5	49,1	53,9
% выделения кислой	27,2	26,1	25,9	39,5	48,6	31,9	36,9	27,8	28,9	26,5
% выделения основной	19,3	20,2	19,5	21,8	22,5	21,8	23,7	20,7	22,0	19,6
Биопроба (% отн. акт.) <sup>4</sup>	84	НП	84	НП	85	НП	82	НП	98	81

<sup>1</sup> - 10 mM гистидин, pH 6,0, 0,2% полисорбат 20, 10% сахарозы, 150 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P;

<sup>2</sup> - значения "без стресса" представляют собой среднее обоих исследований стабильности;

<sup>3</sup> - мутность определяется как относительное изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>4</sup> - процент относительной активности; критерии приемлемости: 50-200% от эталонного стандарта.

Таблица 12

Стабильность 175 мг/мл mAb-316P FDS<sup>1</sup> при стрессовом воздействии

Стресс-тест	Без стресса <sup>2</sup>	Встряхивание		45°C инкубирование		37°C инкубирование		25°C инкубирование		Замор./оттаив.
Время воздействия	0 мин	60 мин	120 мин	14 дн	28 дн	14 дн	28 дн	14 дн	31 дн	8 циклов
Мутность <sup>3</sup>	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,00	0,01	н.д.	0,00	0,01
pH	6,0	6,0	6,0	6,1	6,1	6,0	6,0	н.д.	6,0	6,0
% суммарного выделения	100	96	98	101	98	100	96	н.д.	99	98
% выделения нативного	96,5	96,3	96,4	94,5	91,7	95,7	94,7	н.д.	96,2	96,1
% выделения агрегатов	2,5	2,5	2,5	3,6	5,2	2,8	3,0	н.д.	2,6	2,3
% выделения главной	59,5	58,3	59,0	47,1	38,4	56,3	46,9	н.д.	58,2	59,3
% выделения кислой	30,1	29,3	29,4	39,5	47,6	32,3	39,8	н.д.	30,9	29,5
% выделения основной	10,3	12,4	11,6	13,4	14,1	11,4	13,4	н.д.	11,0	11,1
Биопроба (% отн. акт.) <sup>4</sup>	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,00	0,01	н.д.	0,00	0,01

<sup>1</sup> - 10 mM гистидин, pH 6,0, 0,01% полисорбат 20, 5% сахарозы, 50 mM аргинина, 175 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P;

<sup>2</sup> - значения "без стресса" представляют собой среднее обоих исследований стабильности;

<sup>3</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом;

<sup>4</sup> - процент относительной активности; критерии приемлемости: 50-200% от эталонного стандарта.

Таблица 13

## Стабильность 150 мг/мл mAb-316P DP в PFS

Хранение	0	5°C 6 мес.	25°C 6 мес.	45°C 28 дней
Внешний вид	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,00	0,02
pH	6,1	6,1	6,1	6,1
% суммарного выделения	100	102	102	97
% выделения нативного	96,6	96,1	94,2	92,4
% выделения агрегатов	2,4	2,6	3,2	4,3
% выделения главной	58,4	58,5	45,7	35,8
% выделения кислой	31,8	31,3	42,1	50,9
% выделения основной	9,8	10,2	12,2	13,4

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 14

## Стабильность 175 мг/мл mAb-316P DP в PFS

Хранение	0	5°C 6 мес.	25°C 6 мес.	45°C 28 дней
Внешний вид	Годеи	Годеи	Годеи	Годеи
Мутность <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,02	0,04
pH	6,1	6,1	6,1	6,1
% суммарного выделения	100	103	101	100
% выделения нативного	96,7	96,3	94,6	91,6
% выделения агрегатов	2,3	2,4	3,0	5,4
% выделения главной	59,1	59,7	47,1	37,7
% выделения кислой	31,2	30,6	40,6	48,2
% выделения основной	9,7	9,7	12,3	14,2

<sup>1</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 15

Совместимость 150 мг/мл mAb-316P<sup>1</sup> после 14 дней при 40°C

Хранение	Без хранения Стекло	Стекло	Поли-карбонат	Поли-пропилен	Поли-стирол	Нержавеющая сталь
Мутность <sup>12</sup>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
pH	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0	6,0
% суммарного выделения	100	97	104	99	105	104
% выделения нативного	97,4	95,9	95,8	95,7	95,7	95,5
% суммарного выделения	1,7	2,5	2,6	2,7	2,6	2,7
% Main Recovered	53,3	45,8	45,8	44,7	45,6	45,1
% Acidic Recovered	26,9	33,0	32,9	33,8	33,0	33,5
% Basic Recovered	19,8	21,3	21,6	21,6	21,5	21,4

<sup>1</sup> - 10 mM гистидин, pH 6,0, 0,2% полисорбат 20, 10% сахароза, 150 мг/мл анти-PCSK9 mAb-316P;

<sup>12</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 16

Совместимость 175 мг/мл mAb-316P<sup>1</sup> после 14 дней при 40°C

Хранение	Без хранения Стекло	Стекло	Поли-карбонат	Поли-пропилен	Поли-стирол	Нержавеющая сталь
Мутность <sup>3</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
pH	6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,1
% суммарного выделения	100	98	104	100	105	98
% выделения нативного	96,6	95,3	95,2	95,1	95,2	94,9
% выделения агрегатов	2,4	3,0	3,1	3,2	3,1	3,3
% выделения главной	57,7	51,3	51,0	50,6	51,0	50,4
% выделения кислой	30,0	34,5	34,5	35,0	34,5	35,2
% выделения основной	12,3	14,2	14,5	14,4	14,4	14,4

<sup>1</sup> - 10 mM гистидин, pH 6,0, 0,01% полисорбат 20, 5% сахарозы, 50 mM аргинина и 175 мг/мл mAb;<sup>3</sup> - мутность - изменение OD на 405 нм по сравнению с исходным веществом.

Таблица 17

Гетерогенность заряда mAb-316P по данным КИЭФ

№ пика	Партия 1		Партия 2		Партия 1:Партия 2 (смесь 1:1)	
	pI	Площадь пика, %	pI	Площадь пика, %	pI	Площадь пика, %
1	7,99 (0,01)	0,8 (0,1)	7,99 (0,01)	0,8 (0,0)	7,98 (0,01)	0,7 (0,1)
2	8,15 (0,00)	2,6 (0,1)	8,15 (0,01)	2,6 (0,1)	8,14 (0,01)	2,6 (0,1)
3	8,29 (0,00)	6,9 (0,1)	8,29 (0,00)	7,0 (0,0)	8,28 (0,01)	6,9 (0,1)
4	8,42 (0,00)	18,4 (0,2)	8,42 (0,00)	18,6 (0,2)	8,42 (0,01)	18,5 (0,1)
5	8,54 (0,01)	66,4 (0,3)	8,55 (0,01)	68,0 (0,3)	8,54 (0,00)	67,3 (0,1)
6	8,65 (0,00)	4,0 (0,1)	8,65 (0,00)	2,8 (0,1)	8,64 (0,01)	3,4 (0,0)
7	8,82 (0,00)	0,9 (0,1)	8,81 (0,00)	0,3 (0,1)	8,81 (0,01)	0,6 (0,1)

Таблица 18

Гликозилированные пептиды mAb-316P

№ пика	Тяжелая цепь Фрагмент	Полученная масса (Да)		Комментарии
		Партия 1	Партия 2	
15a	294-302	2957,15	2957,19	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>2</sub>
	294-302	2795,11	2795,11	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>1</sub>
	294-302	2404,94	2404,94	(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>5</sub>
	294-302	2592,02	2591,96	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>1</sub> (Gal) <sub>1</sub>
	294-302	2267,94	2267,92	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>2</sub> (GlcNAc) <sub>1</sub>
15b	294-302	2121,82	2121,80	(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>2</sub> (GlcNAc) <sub>1</sub>
	294-302	2283,91	2283,91	(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>1</sub>
	294-302	2429,98	2429,98	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>1</sub>
	294-302	2486,99	2486,97	(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
16	294-302	2633,05	2633,06	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
	294-302	1188,52	1188,53	non-glycosylated NST site
17a	290-302	3439,44	3439,44	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>2</sub>
	290-302	3278,40	3277,35	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>1</sub>
	290-302	2887,20	2887,26	(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>5</sub>
17b	290-302	2766,24	2766,21	(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>1</sub>
	290-302	2969,34	2969,25	(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
	290-302	2912,28	2912,25	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>1</sub>
	290-302	3115,32	3115,35	(Fuc) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>

Таблица 19

Интегрированные площади пиков гликанов  
по данным капиллярного электрофореза

	Площадь пика партии 1, %	Площадь пика партии 2, %	Площадь пика смесь партий 1:1, %	Идентификация гликана <sup>1</sup>	Структура гликана <sup>2</sup>
1	8,6 (0,2)	6,8 (0,1)	7,6 (0,2)	G0-Fuc	
2	1,8 (0,0)	2,9 (0,1)	2,3 (0,1)	Man5	
3	0,7 (0,0)	0,5 (0,0)	0,6 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
4	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
5	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
6	34,4 (0,1)	45,8 (0,2)	40,4 (0,2)	G0	
7	1,5 (0,0)	0,7 (0,0)	1,1 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
8	Ниже ПО	0,9 (0,0)	0,6 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
9	Ниже ПО	0,7 (0,0)	0,6 (0,0)	Обнаружен небольшой пик	
10	29,5 (0,1)	24,7 (0,0)	27,0 (0,1)	G1(1-6)	
11	10,1 (0,1)	8,6 (0,0)	9,3 (0,1)	G1(1-3) и/или G2-Fuc	
12	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
13	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Обнаружен небольшой пик	
14	11,7 (0,0)	7,1 (0,1)	9,4 (0,2)	G2	

<sup>1</sup> - G#-fuc и G# обозначают нефукозиллированные и фукозиллированные гликаны соответственно. Символ # означает 0, 1 или 2;

<sup>2</sup> - обозначение гликана: ▼ - фукоза, ■ - N-ацетилглюкозамин, ● - манноза, ◆ - галактоза; ПО - предел определения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий фармацевтический состав, включающий:

(a)  $150 \pm 22,5$  мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают человеческую пропротеиновую конвертазу субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), где антитело содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO: 2, HCDR2 с SEQ ID NO: 3, HCDR3 с SEQ ID NO: 4, определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

(b)  $10 \pm 1,5$  mM гистидина (pH  $6,0 \pm 0,3$ );

(c)  $0,01 \pm 0,0015\%$  вес./об. полисорбата 20 и

(d)  $10 \pm 1,5\%$  вес./об. сахарозы.

2. Жидкий фармацевтический состав по п.1 или 2, где антитело содержит варибельный домен тяжелой цепи (HCVD), содержащий SEQ ID NO: 1, и варибельный домен легкой цепи (LCVD), содержащий SEQ ID NO: 5.

3. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором более 90% антител имеет молекулярный вес  $155 \pm 1$  кДа; более 50% антител имеет изоэлектрическую точку около 8,5; и от 75 до 90% антител фукозиллированы.

4. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 91% антитела имеет нативную конформацию через 28 дней при  $45^\circ\text{C}$ .

5. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 35% антитела остается в главной заряженной форме через 28 дней при  $45^\circ\text{C}$ .

6. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 94% антитела имеют нативную конформацию через 6 месяцев при  $25^\circ\text{C}$ .

7. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 45% антитела остается в



главной заряженной форме через 6 месяцев при 25°C.

8. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 96% антитела имеет нативную конформацию через 6 месяцев при 5°C.

9. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 58% антитела остается в главной заряженной форме через 6 месяцев при 5°C.

10. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 96% антитела остается в главной заряженной форме через три месяца при -20, -30 или -80°C.

11. Жидкий фармацевтический состав по п.1, в котором по меньшей мере 56% антитела остаются в главной заряженной форме через три месяца при -20, -30 или -80°C.

12. Жидкий фармацевтический состав по п.1, где состав содержит 150 мг/мл антитела.

