

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045816**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.28**

**(21)** Номер заявки  
**201991951**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.02.22**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2017.01)

---

**(54) НИЗКОВЯЗКИЕ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ ЭВОЛОКУМАБА И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

---

**(31)** 62/462,266

**(32)** 2017.02.22

**(33)** US

**(43)** 2020.01.21

**(86)** PCT/US2018/019189

**(87)** WO 2018/156741 2018.08.30

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

**(72)** Изобретатель:  
Слоуи Кристофер Джеймс, Канапурам  
Секхар (US), Цуй Хуаньчунь (CN),  
Чань Чжо Муй, Бинабаджи Элахех  
(US)

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

**(56)** WO-A1-2013166448  
WO-A1-2016065181  
WO-A2-2018064307  
WO-A1-2018067987  
SANDEEP YADAV ET AL.: "The Influence of Charge Distribution on Self-Association and Viscosity Behavior of Monoclonal Antibody Solutions", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 9, no. 4, 2 April 2012 (2012-04-02), pages 791-802, XP055134188, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp200566k, whole document, especially the Abstract; Figure 1

---

**(57)** В данном изобретении предусмотрены составы на основе PCSK9-связывающих полипептидов, такие как составы, содержащие эволюкумаб, которые содержат N-ацетиларгинин и характеризуются сниженной вязкостью по сравнению с составами, не содержащими N-ацетиларгинин. В данном документе также предусмотрены способы составления таких композиций, которые имеют преимущество в том, что они сохраняют определенные компоненты. Такие составы, содержащие PCSK9-связывающие полипептиды, можно вводить пациентам для лечения и/или предупреждения связанных с PCSK9 заболеваний, состояний и нарушений.

---

**B1**

**045816**

**045816  
B1**

### Родственные заявки

Настоящее изобретение испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/462266, поданной 22 февраля 2017 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка подается с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием "A-2112-WO-PCST sequence listing ST25.txt", созданного 31 января 2018 года и имеющего размер 21 килобайт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Область изобретения

Представленный объект изобретения относится к области техники фармацевтических композиций на основе эволюкумаба и других PCSK9-связывающих полипептидов и способам снижения вязкости таких композиций. В частности, представленный объект изобретения относится к фармацевтическим композициям на основе эволюкумаба и других PCSK9-связывающих полипептидов, содержащим N-ацетиларгинин, и к применению N-ацетиларгинина для уменьшения вязкости высококонцентрированных составов на основе эволюкумаба и других PCSK9-связывающих полипептидов. Более того, раскрытый объект изобретения представляет способы, связанные с получением таких фармацевтических композиций.

### Уровень техники

Терапевтические антитела составляют в виде раствора для введения, такого как парентеральная инъекция. В случае продуктов, которые вводятся подкожно в ходе самостоятельного введения, плохо переносимыми являются составы, для которых требуются объемы введения, превышающие 1-2 миллилитра. Чтобы решить данную проблему, антитела можно составлять при высоких концентрациях (например, таких как от 70 мг/мл до 210 мг/мл или больше), таким образом уменьшая размер дозы.

Однако некоторые высококонцентрированные составы на основе антител может быть сложно изготавливать и вводить. Например, в составе на основе эволюкумаба (REPATHA®), моноклонального антитела, которое связывает PCSK9, концентрации эволюкумаба выше приблизительно 70 мг/мл характеризуются повышенной вязкостью. Однако эффективные дозы эволюкумаба составляют 210 мг Q2W или 420 мг Q4W. С высоковязкими составами не только тяжело обращаться во время производства, включая стадии нерасфасованного вещества и заполнения, но их также тяжело втягивать в шприц и инъектировать, что делает введение пациенту тяжелым и неприятным.

Чтобы снизить вязкость составов на основе антитела, немодифицированные аминокислоты аргинин, глицин, серин или пролин добавляли к композициям на основе антитела. Например, составы на основе антитела, содержащие 80 мг/мл антитела и от 75 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл аргинина, можно лиофилизировать и восстановить до 120-200 мг/мл; при этом конечные концентрации аргинина могут составлять от 431 до 718 мМ (Mogichika & Kameoka, 2007). Хотя аргинин снижал вязкость составов по сравнению с контролями (Mogichika & Kameoka, 2007). Более того, влияние аргинина было недостаточным для снижения вязкости эволюкумаба до требуемых уровней.

В области техники существует потребность в снижении вязкости составов, содержащих эволюкумаб и другие PCSK9-связывающие полипептиды, с помощью соединений, которые являются более эффективными, чем аргинин.

### Краткое описание

В первом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая:

- a) PCSK9-связывающий полипептид, который выбран из группы, состоящей из:
  - i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;
  - ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;
  - iii) моноклонального антитела, содержащего:
    - 1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и
    - 2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;
    - iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;
  - v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпи-

топа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

- 1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и
- 2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и
- 3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым

связывается домен EGF-A из LDLR; и

- b) N-ацетиларгинин,

где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 80 сП. В таком первом аспекте PCSK9-связывающий полипептид может представлять собой моноклональное антитело, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR):

a) CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и

b) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. Более того, в данном первом аспекте фармацевтическая композиция может характеризоваться вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 50 сП. Фармацевтическая композиция может характеризоваться осмоляльностью, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм/кг, такой как приблизительно 300 мОсм/кг, или является изотонической для клетки крови человека. Концентрация PCSK9-связывающего полипептида может составлять от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 260 мг/мл, например, 210 мг/мл. N-ацетиларгинин может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ, такой как от 140 мМ до приблизительно 170 мМ, или при 140 мМ. Фармацевтическая композиция по данному аспекту может дополнительно содержать буфер, такой как буфер, выбранный из группы, состоящей из ацетатного, глутаматного, гистидинового и фосфатного буферов или их комбинации. Буфер может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ. В некоторых случаях буфер представляет собой ацетат натрия и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. Значение pH таких фармацевтических композиций может составлять от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9, например, значение pH составляет приблизительно 5,4. Фармацевтические композиции по данному аспекту могут дополнительно содержать поверхностно-активное вещество, такое как поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®), полиэтиленгликольоктилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D- $\alpha$ -токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS). Поверхностно-активное вещество может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1% (вес/объем). В некоторых фармацевтических композициях по данному аспекту поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем). Более того, фармацевтические композиции по данному аспекту могут дополнительно содержать пролин, который может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ, например, от 90 до 120 мМ, или при приблизительно 120 мМ. В некоторых случаях фармацевтическая композиция по данному первому аспекту может дополнительно содержать соль аргинина, которая может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, например, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ. Соль аргинина может представлять собой, например, аргинин-HCl, аргинина ацетат или аргинина глутамат. В некоторых случаях соль аргинина представляет собой аргинин-HCl и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ. PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно двух лет или даже пяти лет или больше, если он хранится при приблизительно -30°C или ниже в фармацевтических композициях по данному первому аспекту. При 5°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение от по меньшей мере приблизительно шести месяцев до приблизительно 24 месяцев или больше в таких фармацевтических композициях. При 25°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно одного месяца или дольше, трех месяцев или дольше, или даже шести месяцев или дольше. При 40°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере одного месяца или дольше. Фармацевтические композиции по данному первому аспекту могут содержать высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающих полипептидов на уровне менее приблизительно 3%, например, 2,5% или меньше от общей концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Во втором аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая:

- a) PCSK9-связывающий полипептид, который выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последо-

вательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

- ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;
- iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

- 1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и
- 2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и
- 3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым

связывается домен EGF-A из LDLR; и

- b) N-ацетиларгинин;
- c) соль аргинина;
- d) буфер и
- e) поверхностно-активное вещество,

где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 80 сП.

В данном втором аспекте PCSK9-связывающий полипептид представляет собой моноклональное антитело, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR):

a) CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и

b) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

Фармацевтические композиции по данному второму аспекту могут характеризоваться вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 50 сП. Фармацевтическая композиция может характеризоваться осмоляльностью, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм/кг, такой как приблизительно 300 мОсм/кг, или является изотонической для клетки крови человека. Концентрация PCSK9-связывающего полипептида может составлять от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 260 мг/мл, например, 210 мг/мл. N-ацетиларгинин может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ, такой как от 140 мМ до приблизительно 170 мМ, или при 140 мМ. Фармацевтическая композиция по данному аспекту может дополнительно содержать буфер, такой как буфер, выбранный из группы, состоящей из ацетатного, глутаматного, гистидинового и фосфатного буферов или их комбинации. Буфер может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ. В некоторых случаях буфер представляет собой ацетат натрия и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. Значение pH таких фармацевтических композиций может составлять от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9, например, значение pH составляет приблизительно 5,4. Фармацевтические композиции по данному аспекту могут дополнительно содержать поверхностно-активное вещество, такое как поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®), полиэтиленгликольфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликольалкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS). Поверхностно-активное вещество может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1% (вес/объем). В некоторых фармацевтических композициях по данному аспекту поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем). Более того, фармацевтические композиции по данному аспекту могут дополнительно содержать пролин; при этом пролин может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ,

такой как от 90 до 120 мМ, или при приблизительно 120 мМ. В некоторых случаях фармацевтическая композиция по данному второму аспекту может дополнительно содержать соль аргинина, которая может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, такой как от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ. Соль аргинина может представлять собой, например, аргинин-НСl, аргинина ацетат или аргинина глутамат. В некоторых случаях соль аргинина представляет собой аргинин-НСl и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ. PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно двух лет или даже пяти лет или больше, если он хранится при приблизительно -30°C или ниже в фармацевтических композициях по данному второму аспекту. При 5°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение от по меньшей мере приблизительно шести месяцев до приблизительно 24 месяцев или больше в таких фармацевтических композициях. При 25°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно одного месяца или дольше, трех месяцев или дольше, или даже шести месяцев или дольше. При 40°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере одного месяца или дольше. Фармацевтические композиции по данному второму аспекту могут содержать высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающих полипептидов на уровне менее приблизительно 3%, например, 2,5% или меньше от общей концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

В третьем аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая:

а) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ;

c) аргинин-НСl, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ;

d) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем); и

e) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

В данном третьем аспекте фармацевтическая композиция может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7, таким как значение pH, составляющее приблизительно 5,4. Фармацевтическая композиция может характеризоваться вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 50 сП.

В четвертом аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая:

а) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой

цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

b) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

c) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ;

d) аргинин-HCl, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ;

e) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015%; и

f) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

В данном четвертом аспекте фармацевтическая композиция может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7, таким как значение pH, составляющее приблизительно 5,4. Фармацевтическая композиция может характеризоваться вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 80 сП.

В пятом аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая:

a) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ;

c) аргинин-HCl, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 70 мМ;

d) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем); и

e) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

В данном пятом аспекте фармацевтическая композиция может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7, таким как значение pH, составляющее приблизительно 5,4. Фармацевтическая композиция может характеризоваться вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 45 сП.

В шестом аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая:

a) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей при-

близительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 170 мМ;

c) аргинин-HCl, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ;

d) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015%; и

e) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

В данном шестом аспекте фармацевтическая композиция может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7, таким как значение pH, составляющее приблизительно 5,4. Фармацевтическая композиция может характеризоваться вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 60 сП.

В седьмом аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая:

a) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3:

S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ;

c) пролин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 120 мМ;

d) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от при-

близительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем); и

е) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

В данном седьмом аспекте фармацевтическая композиция может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7, таким как значение pH, составляющее приблизительно 5,4. Фармацевтическая композиция может характеризоваться вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 60 сП.

В данных аспектах с первого по седьмой PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно двух лет или даже пяти лет или больше, если он хранится при приблизительно  $-30^{\circ}\text{C}$  или ниже в фармацевтических композициях по данным аспектам. При  $5^{\circ}\text{C}$  PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение от по меньшей мере приблизительно шести месяцев до приблизительно 24 месяцев или больше в таких фармацевтических композициях. При  $25^{\circ}\text{C}$  PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно одного месяца или дольше, трех месяцев или дольше, или даже шести месяцев или дольше. При  $40^{\circ}\text{C}$  PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере одного месяца или дольше. Фармацевтические композиции по данным аспектам могут содержать высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающих полипептидов на уровне менее приблизительно 3%, например, 2,5% или меньше от общей концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

В любом из предыдущих аспектов фармацевтическая композиция может представлять собой жидкость.

В восьмом аспекте в данном документе раскрыт способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение фармацевтической композиции по любому из предыдущих семи аспектов.

В девятом аспекте в данном документе раскрыт набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из аспектов с первого по седьмой и устройство для доставки. Устройство для доставки может быть выбрано из группы, состоящей из шприца, шприца-ручки, нательного инъектора и автоинъектора. Набор может дополнительно содержать инструкции для введения фармацевтической композиции с применением устройства для доставки.

В десятом аспекте в данном документе раскрыт способ получения фармацевтической композиции на основе PCSK9-связывающего полипептида, содержащей по меньшей мере 140 мг/мл PCSK9-связывающего полипептида, предусматривающий добавление к фармацевтической композиции, содержащей PCSK9-связывающий полипептид, эффективного количества N-ацетиларгинина, вследствие чего вязкость фармацевтической композиции снижается по сравнению с фармацевтической композицией, не содержащей N-ацетиларгинин, и где PCSK9-связывающий полипептид выбран из группы, состоящей из:

а) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

b) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

c) моноклонального антитела, содержащего:

i) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

ii) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

d) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238; и

e) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

i) переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

ii) переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

iii) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR.

В данном десятом аспекте вязкость фармацевтической композиции составляет менее приблизительно 80 сП или менее приблизительно 50 сП. Фармацевтическая композиция из способа по данному аспекту может характеризоваться осмоляльностью, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм/кг, такой как приблизительно 300 мОсм/кг, или является изотонической для клетки крови человека. Концентрация PCSK9-связывающего полипептида может составлять от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 260 мг/мл, например, 210 мг/мл. N-ацетиларгинин может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ, такой как от 140 мМ

до приблизительно 170 мМ, или при 140 мМ. Фармацевтическая композиция по данному аспекту может дополнительно содержать буфер, такой как буфер, выбранный из группы, состоящей из ацетатного, глутаматного, гистидинового и фосфатного буферов или их комбинации. Буфер может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ. В некоторых случаях буфер представляет собой ацетат натрия и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. Значение pH таких фармацевтических композиций может составлять от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9, например, значение pH составляет приблизительно 5,4. Фармацевтические композиции по данному аспекту могут дополнительно содержать поверхностно-активное вещество, такое как поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликольоктилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS). Поверхностно-активное вещество может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1% (вес/объем). В некоторых фармацевтических композициях по данному аспекту поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем). Более того, фармацевтические композиции по данному аспекту могут дополнительно содержать пролин; при этом пролин может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ, такой как от 90 до 120 мМ, или при приблизительно 120 мМ. В некоторых случаях фармацевтическая композиция по данному десятому аспекту может дополнительно содержать соль аргинина, которая может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, такой как от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ. Соль аргинина может представлять собой, например, аргинин-HCl, аргинина ацетат или аргинина глутамат. В некоторых случаях соль аргинина представляет собой аргинин-HCl и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ. PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно двух лет или даже пяти лет или больше, если он хранится при приблизительно -30°C или ниже в фармацевтических композициях по данному десятому аспекту. При 5°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение от по меньшей мере приблизительно шести месяцев до приблизительно 24 месяцев или больше в таких фармацевтических композициях. При 25°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере приблизительно одного месяца или дольше, трех месяцев или дольше, или даже шести месяцев или дольше. При 40°C PCSK9-связывающий полипептид может быть стабильным в течение по меньшей мере одного месяца или дольше. Фармацевтические композиции по данному десятому аспекту могут содержать высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающих полипептидов на уровне менее приблизительно 3%, например, 2,5% или меньше от общей концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

В одиннадцатом аспекте в данном документе раскрыт способ составления терапевтического полипептида, предусматривающий:

- a) первую стадию концентрирования, на которой полипептид в первом растворе концентрируют;
- b) первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй раствор, содержащий N-ацетиларгинин, с применением диафильтрации;
- c) вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют;
- d) вторую стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин, с применением диафильтрации; и
- e) третью стадию концентрирования, на которой полипептид в третьем растворе концентрируют; где терапевтический полипептид предусматривает PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR и выбран из группы, состоящей из:
  - i) моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;
  - ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;
  - iii) моноклонального антитела, содержащего:
    - 1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и
    - 2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID

NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGFA из LDLR.

В способах по данному одиннадцатому аспекту PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR, может представлять собой моноклональное антитело, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарности области (CDR):

a) CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и

b) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

Более того, в данном одиннадцатом аспекте перед третьей стадией концентрирования температуру раствора, содержащего полипептид, можно повышать от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C. Также первую стадию замены раствора можно осуществлять с применением по меньшей мере трех диавъемов второго раствора. В некоторых подаспектах данного одиннадцатого аспекта вторую стадию замены раствора проводят с применением по меньшей мере четырех диавъемов третьего раствора. В других подаспектах начальная концентрация терапевтического белка составляет приблизительно 11 мг/мл или меньше. Кроме того, концентрацию терапевтического полипептида можно повышать в от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, так как, например, когда повышенная концентрация полипептида составляет от приблизительно 35 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл. В некоторых подаспектах на второй стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 2 до 4 раз относительно первой стадии концентрирования, до такой как, например, приблизительно 140 мг/мл. На третьей стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида может повышаться в от приблизительно 1,5 до приблизительно 2 раз относительно второй стадии концентрирования, до такой как приблизительно 260 мг/мл. Следовательно, терапевтический полипептид может характеризоваться конечной концентрацией, которая в по меньшей мере приблизительно 19-20 раз превышает начальную концентрацию терапевтического полипептида, такой как приблизительно 210 мг/мл. Стадии концентрирования могут предусматривать ультрафильтрацию с периодической загрузкой; к тому же, второй раствор и третий раствор могут быть идентичными. Например, второй или третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин, может содержать соль аргинина и буфер, где, например, N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ; соль аргинина представляет собой Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат и присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ; и буфер представляет собой натрий-ацетатный буфер при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ. В других подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 до приблизительно 170 мМ; Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 63 до приблизительно 70 мМ, и натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В еще одних подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В дополнительных подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 70 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В еще одних подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 170 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. Более того, композиции могут дополнительно содержать пролин, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ. Второй или третий раствор может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9, таким как 5,4. На первой и второй стадиях замены раствора можно применять мембрану для диалитации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

a) размера отверстий сетки, который превышает приблизительно 350 мкм, но меньше или равен

приблизительно 500 мкм;

b) площади живого сечения, которая превышает приблизительно 32%, но меньше или равна приблизительно 36% от площади мембраны;

c) плотности сетки, составляющей менее приблизительно 16,2 нити/см, но больше или равной приблизительно 12,2 нити/см;

d) диаметра нити, который превышает приблизительно 270 мкм, но меньше или равен приблизительно 340 мкм;

e) базового веса, который превышает приблизительно 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равен 180 г/м<sup>2</sup>;

f) толщины, которая превышает приблизительно 515 мкм, но меньше или равна приблизительно 610 мкм;

g) загрузки мембраны, превышающей приблизительно 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной приблизительно 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и

h) максимального давления подачи, составляющего приблизительно 60 psi.

Более того, к третьему раствору после концентрирования можно добавлять поверхностно-активное вещество, такое как поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликольоктилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D- $\alpha$ -токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS). Поверхностно-активное вещество может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1% (вес/объем). В некоторых фармацевтических композициях по данному аспекту поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

В двенадцатом аспекте в данном документе раскрыт способ составления терапевтического полипептида, предусматривающий:

a) первую стадию концентрирования, на которой полипептид в первом растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;

b) первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй раствор, содержащий N-ацетиларгинин, соль аргинина и буфер, с применением диафильтрации и трех диаобъемов второго раствора;

c) вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;

d) вторую стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин, соль аргинина и буфер, с применением диафильтрации и четырех диаобъемов третьего раствора;

e) температуру раствора, содержащего полипептид, повышают от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C после второй стадии замены раствора; и

f) третью стадию концентрирования, на которой полипептид дополнительно концентрируют с применением концентрирования с помощью ультрафильтрации с периодической загрузкой;

где на первой и второй стадиях замены раствора можно применять мембрану для диафильтрации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

a) размера отверстий сетки, который превышает приблизительно 350 мкм, но меньше или равен приблизительно 500 мкм;

b) площади живого сечения, которая превышает приблизительно 32%, но меньше или равна приблизительно 36% от площади мембраны;

c) плотности сетки, составляющей менее приблизительно 16,2 нити/см, но больше или равной приблизительно 12,2 нити/см;

d) диаметра нити, который превышает приблизительно 270 мкм, но меньше или равен приблизительно 340 мкм;

e) базового веса, который превышает приблизительно 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равен 180 г/м<sup>2</sup>;

f) толщины, которая превышает приблизительно 515 мкм, но меньше или равна приблизительно 610 мкм;

g) загрузки мембраны, превышающей приблизительно 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной приблизительно 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и

h) максимального давления подачи, составляющего приблизительно 60 psi; и

где терапевтический полипептид предусматривает PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR и выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

- ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;
- iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGFA из LDLR.

Более того, в данном двенадцатом аспекте первую стадию замены раствора можно проводить с применением по меньшей мере трех диаобъемов второго раствора. В некоторых подаспектах данного двенадцатого аспекта вторую стадию замены раствора проводят с применением по меньшей мере четырех диаобъемов третьего раствора. В других подаспектах начальная концентрация терапевтического белка составляет приблизительно 11 мг/мл или меньше. Кроме того, концентрацию терапевтического полипептида можно повышать в от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, так как, например, когда повышенная концентрация полипептида составляет от приблизительно 35 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл. В некоторых подаспектах на второй стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 2 до 4 раз относительно первой стадии концентрирования, до такой как, например, приблизительно 140 мг/мл. На третьей стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида может повышаться в от приблизительно 1,5 до приблизительно 2 раз относительно второй стадии концентрирования, до такой как приблизительно 260 мг/мл. Следовательно, терапевтический полипептид может характеризоваться конечной концентрацией, которая в по меньшей мере приблизительно 19-20 раз превышает начальную концентрацию терапевтического полипептида, такой как приблизительно 210 мг/мл. Стадии концентрирования могут предусматривать ультрафильтрацию с периодической загрузкой; к тому же, второй раствор и третий раствор могут быть идентичными. N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ; соль аргинина может представлять собой Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат, где Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ; и буфер представляет собой натрий-ацетатный буфер при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ. В других подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 до приблизительно 170 мМ; Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 63 до приблизительно 70 мМ, и натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В еще одних подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В дополнительных подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 70 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В еще одних подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 170 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. Более того, композиции могут дополнительно содержать пролин, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ. Второй или третий раствор может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9, таким как 5,4. Более того, к третьему раствору после концентрирования можно добавлять поверхностно-активное вещество, такое как поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полосамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных

сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликольоктилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D- $\alpha$ -токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS). Поверхностно-активное вещество может присутствовать при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1% (вес/объем). В некоторых фармацевтических композициях по данному аспекту поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

В тринадцатом аспекте в данном документе раскрыт способ составления терапевтического полипептида, предусматривающий:

а) первую стадию концентрирования, на которой полипептид в первом растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;

б) первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй с применением диафильтрации и трех диаобъемов второго раствора;

с) вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;

д) вторую стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор с применением диафильтрации и четырех диаобъемов третьего раствора;

е) температуру раствора, содержащего полипептид, повышают от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C после второй стадии замены раствора; и

ф) третью стадию концентрирования, на которой полипептид дополнительно концентрируют с применением концентрирования с помощью ультрафильтрации с периодической загрузкой;

г) в качестве альтернативы стадию добавления полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80) при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем) к раствору, полученному на третьей стадии концентрирования,

где второй и третий растворы предусматривают раствор, выбранный из группы, состоящей из раствора, содержащего приблизительно 140 мМ N-ацетиларгинина, приблизительно 50 мМ Arg-HCl и приблизительно 10 мМ ацетата натрия, при этом раствор характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 5,2; раствора, содержащего приблизительно 155 мМ N-ацетиларгинина, приблизительно 70 мМ Arg-HCl и приблизительно 10 мМ ацетата натрия, при этом раствор характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 5,4; и раствора, содержащего приблизительно 170 мМ N-ацетиларгинина, приблизительно 10 мМ ацетата натрия, при этом раствор характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 5,6;

где на первой и второй стадиях замены раствора можно применять мембрану для диафильтрации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

а) размера отверстий сетки, который превышает приблизительно 350 мкм, но меньше или равен приблизительно 500 мкм;

б) площади живого сечения, которая превышает приблизительно 32%, но меньше или равна приблизительно 36% от площади мембраны;

с) плотности сетки, составляющей менее приблизительно 16,2 нити/см, но больше или равной приблизительно 12,2 нити/см;

д) диаметра нити, который превышает приблизительно 270 мкм, но меньше или равен приблизительно 340 мкм;

е) базового веса, который превышает приблизительно 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равен 180 г/м<sup>2</sup>;

ф) толщины, которая превышает приблизительно 515 мкм, но меньше или равна приблизительно 610 мкм;

г) загрузки мембраны, превышающей приблизительно 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной приблизительно 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и

h) максимального давления подачи, составляющего приблизительно 60 psi; и

где терапевтический полипептид предусматривает PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR и выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и

легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарности области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGfA из LDLR.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана диаграмма по данным эксклюзионной хроматографии-жидкостной хроматографии высокого давления (SE-HPLC) для образцов эволокумаба при высоких концентрациях в различных составах, содержащих N-ацетиларгинин, после 1 месяца инкубации при 40°C. Обозначения для составов, указанных на оси x: [ацетат (мМ)]/[N-ацетиларгинин (мМ)] / [пролин (мМ)]. По оси Y указана процентная доля образца, которую составляют высокомолекулярные (HMW) разновидности (агрегаты и олигомеры эволокумаба).

На фиг. 2 показана диаграмма сравнения вязкости составов на основе эволокумаба с концентрацией 210 мг/мл при скорости сдвига 1000 с<sup>-1</sup> при 25°C.

На фиг. 3А показаны диаграммы, полученные с помощью программного обеспечения JMP Prediction Profiler на основании данных SE-HPLC для состава на основе эволокумаба, выдерживаемого при 40°C в течение одного месяца. На фиг. 3В показаны аналогичные данные, за исключением того, что образцы выдерживали при 25°C в течение трех месяцев.

На фиг. 4 показана столбчатая диаграмма процентного содержания HMW-разновидностей по результатам SE-HPLC для составов на основе эволокумаба с концентрацией 210 мг/мл, выдерживаемых при 40°C в течение одного месяца. В составах варьировались концентрации N-ацетиларгинина и концентрации аргинина-HCl при различных значениях pH.

На фиг. 5А-5С показаны хроматограммы SE-HPLC для выбранных образцов эволокумаба со значениями pH 4,8 и pH 5,4, выдерживаемых при указанных температурах и в течение указанных периодов времени (5°C в течение шести месяцев (фиг. 5А); 25°C в течение трех месяцев (фиг. 5В) и 40°C в течение одного месяца (фиг. 5С)), и в сравнении с контрольным составом на основе эволокумаба, содержащего пролин. Обозначения для составов: [ацетат (мМ)]/[N-ацетиларгинин (мМ)]/[аргинин-HCl (мМ)].

На фиг. 6А и 6В показаны диаграммы процентного содержания HMW-разновидностей, которые возникли с течением времени в указанных составах на основе эволокумаба, выдерживаемых при указанных температурах (5°C (фиг. 6А); 25°C (фиг. 6В)). Тестируемые составы на основе эволокумаба с концентрацией 210 мг/мл, содержащие N-ацетиларгинин, сравнивают с контрольным составом на основе эволокумаба с концентрацией 140 мг/мл, содержащего пролин. Обозначения для составов: [ацетат (мМ)]/[N-ацетиларгинин (мМ)]/[аргинин-HCl (мМ)].

На фиг. 7А показаны диаграммы, полученные с помощью программного обеспечения JMP Prediction Profiler по данным катионообменной хроматографии-жидкостной хроматографии высокого давления (СЕХ-HPLC) для составов на основе эволокумаба, выдерживаемых при 40°C в течение одного месяца. На фиг. 7В показаны аналогичные данные, за исключением того, что образцы выдерживали при 25°C в течение трех месяцев. Дополнительные подробности см. в разделе "Примеры".

На фиг. 8 показана диаграмма величины кислотного пика в процентах по результатам СЕХ-HPLC для составов на основе эволокумаба с концентрацией 210 мг/мл, выдерживаемых при 40°C в течение одного месяца.

На фиг. 9А-9В показаны диаграммы числа частиц, невидимых невооруженным глазом, как определено путем подсчета частиц суспензии с помощью светоблокировки (больше или равных 10 мкм, фиг. 9А; или больше или равных 25 мкм, фиг. 9В), на миллилитр различных составов на основе эволокумаба, выдерживаемых при 5, 25 и 40°C в течение трех месяцев. На фиг. 9С показана диаграмма числа частиц, невидимых невооруженным глазом, как определено путем подсчета частиц суспензии с помощью светоблокировки (больше или равных 10 мкм или 25 мкм), в различных составах на основе эволокумаба, выдерживаемых при 5°C или 25°C в течение шести месяцев.

На фиг. 10 показана диаграмма числа частиц, невидимых невооруженным глазом, в различных составах на основе эволокумаба, как определено путем анализа с помощью визуализации микропотока (MFI), отфильтрованных по аспектному отношению (AR), составляющему менее 0,70.

На фиг. 11 показана итоговая диаграмма вязкости различных составов на основе эволокумаба, выдерживаемых в течение определенных периодов времени и при указанных температурах, где ТО обозна-

чат начальные значения вязкости.

На фиг. 12 показана диаграмма и таблица, в которых показаны значения рН составов на основе эволюкумаба, отличающихся друг от друга значением рН и буфером, с течением времени вплоть до трех месяцев. Образцы выдерживали при 40°C.

На фиг. 13А-13С показаны диаграммы по данным SE-HPLC, на которых продемонстрировано влияние значения рН на процентное содержание НМВ-разновидностей в составах на основе эволюкумаба с концентрацией 210 мг/мл, которые отличаются значением рН и буфером, в течение вплоть до трех месяцев при 4°C (фиг. 13А), 25°C (фиг. 13В) и 40°C (фиг. 13С). В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 14 показана диаграмма уровней содержания олигомеров в составах на основе эволюкумаба при варьирующем значении рН сразу после составления.

На фиг. 15 показаны хроматограммы, демонстрирующие различные размеры белковых молекул в составах на основе эволюкумаба, которые отличаются значением рН и буфером, после выдерживания при 40°C в течение трех месяцев.

(LMW=низкомолекулярные разновидности).

На фиг. 16А-16С показаны диаграммы по данным из анализов СЕХ-HPLC (% главного пика) составов на основе эволюкумаба с концентрацией 210 мг/мл, которые отличаются значением рН и буфером, с течением времени. На фиг. 16А показана величина главного пика в процентах для образцов, выдерживаемых при 5°C, с течением времени, в то же время на фиг. 16В показан тот же тип данных для образцов, выдерживаемых при 25°C, а на фиг. 16С показан тот же тип данных для образцов, выдерживаемых при 40°C. В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 17 показана диаграмма по данным из анализов СЕХ-HPLC составов на основе эволюкумаба с концентрацией 210 мг/мл, которые отличаются значением рН и буфером, выдерживаемых при 40°C, с течением времени, в которых измеряют процентную величину для разновидностей в кислой среде в составах. В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 18 показаны хроматограммы по данным СЕХ-HPLC для составов на основе эволюкумаба с концентрацией 210 мг/мл, которые отличаются значением рН и буфером, выдерживаемых при 25°C в течение трех месяцев, с анализом, показывающим кислотные и основные, а также главный пики для разновидностей. В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 19 показаны хроматограммы по данным пептидного картирования для различных составов на основе эволюкумаба, отличающихся значением рН и буфером, при этом образцы выдерживались при 40°C в течение одного месяца. В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 20 показана диаграмма, обобщающая результаты нескольких экспериментов, в которых анализировали эволюкумаб в составах, которые отличаются значением рН и буфером, после 1 месяца при 40°C. Все образцы содержат 10 мМ буфера, 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80. Для дополнительных подробностей смотрите фигуру и раздел "Примеры".

На фиг. 21А-21В показаны диаграммы числа частиц, невидимых невооруженным глазом, как определено путем подсчета частиц суспензии с помощью светоблокировки (больше или равных 10 мкм, фиг. 21А; или больше или равных 25 мкм, фиг. 21В), на миллилитр различных составов на основе эволюкумаба, отличающихся значением рН и буфером, выдерживаемых при 5°C, 25°C и 40°C в течение двух месяцев. На фиг. 21С-21D показаны диаграммы числа частиц, невидимых невооруженным глазом (больше или равных 10 мкм, фиг. 21С; больше или равных 25 мкм, фиг. 21D), в составах на основе эволюкумаба, отличающихся значением рН и буфером, выдерживаемых при 5°C или 25°C в течение шести месяцев. В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 22 показана диаграмма числа частиц, невидимых невооруженным глазом, в составах на основе эволюкумаба, которые отличаются значением рН и буфером, как установлено с помощью визуализации микропотока (МФИ). В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 23 показана диаграмма по результатам анализов с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS), проводимых в отношении составов на основе эволюкумаба с концентрацией 210 мг/мл, отличающихся значением рН и буфером, выдерживаемых при 25°C в течение 6 месяцев. В дополнение к 10 мМ каждого перечисленного буфера все образцы содержат 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 24 показана диаграмма зависимости между вязкостью и значением рН составов на основе эволюкумаба, которые отличаются значением рН и буфером. Все образцы содержат 10 мМ буфера, 165 мМ N-ацетиларгинина, 75 мМ аргинина-НСl и 0,01% полисорбата-80.

На фиг. 25A-25C показаны диаграммы процентного содержания НМW-разновидностей, как измерено с помощью SE-HPLC для разных составов на основе эволокумаба, выдерживаемых в течение указанных периодов времени при 5°C (фиг. 25A), 25°C (фиг. 25B) и 40°C (фиг. 25C). Обозначения для составов: [ацетат (мМ)]/[N-ацетиларгинин (мМ)]/[аргинин-НСl (мМ)].

На фиг. 26A-26C показаны диаграммы величины кислотного пика в процентах, как измерено с помощью СЕХ-HPLC для разных составов на основе эволокумаба, выдерживаемых в течение указанных периодов времени при 5°C (фиг. 26A), 25°C (фиг. 26B) и 40°C (фиг. 26C). Обозначения для составов: [ацетат (мМ)]/[N-ацетиларгинин (мМ)]/[аргинин-НСl (мМ)].

На фиг. 27 показана диаграмма процентного содержания предшественников LC+LC+НС (LC=легкая цепь, НС=тяжелая цепь), измеренного с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS) для разных составов на основе эволокумаба, выдерживаемых в течение трех месяцев при 5°C, 25°C и 40°C, по сравнению с начальными уровнями (Т0). Обозначения для составов: [ацетат (мМ)]/[N-ацетиларгинин (мМ)]/[аргинин-НСl (мМ)].

На фиг. 28 показана диаграмма вязкости разных составов на основе эволокумаба с тремя разными концентрациями эволокумаба, при этом данные по вязкости определяли с применением реометра при скоростях сдвига вплоть до 90000 с<sup>-1</sup> при указанных температурах. Обозначения для составов: [ацетат (мМ)]/[N-ацетиларгинин (мМ)]/[аргинин-НСl (мМ)].

На фиг. 29 показана диаграмма по данным потока в ходе UF/DF для эволокумаба в трех буферах для составов с NAR.

На фиг. 30 показана диаграмма процентной доли образования НМW-разновидностей в процессе UF/DF эволокумаба при 35 мг/мл и 70 мг/мл эволокумаба на стадии UF1/DF1 (UF/DF-70 и UF/DF-35). На фигуре также показана концентрация эволокумаба в мг/мл на каждой стадии процесса для двух начальных концентраций эволокумаба.

На фиг. 31A-31F показаны диаграммы по данным SE-HPLC (фиг. 31A, 31C и 31E) и СЕХ-HPLC (фиг. 31B, 31D и 31F) для эволокумаба в составах, содержащих NAR, при значении рН 5,2 (фиг. 31A и 31B), значении рН 5,4 (фиг. 31C и 31D) и значении рН 5,6 (фиг. 31E и 31F). На фигурах также показано процентное содержание НМW-разновидностей, процентное содержание LMW-разновидностей и процентное содержание эволокумаба на различных стадиях в ходе процесса UF/DF.

На фиг. 32 показана величина образования НМW-разновидностей в процентах в образце DS эволокумаба с NAR из исследований с выдерживанием пула при 2-8°C и комнатной температуре.

На фиг. 33 показана диаграмма величины образования НМW-разновидностей в процентах в ОС-образцах эволокумаба с NAR из исследований с выдерживанием пула при повышенной температуре.

На фиг. 34 показана диаграмма измерений вязкости составов на основе эволокумаба с NAR при разных температурах.

На фиг. 35A-35C показаны диаграммы по данным SE-HPLC для всех исследуемых составов, используемых в примере 9, после инкубации при 4°C (фиг. 35A), 25°C (фиг. 35B) и 40°C (фиг. 35C) вплоть до 6 месяцев. На фиг. 35D отражены данные SE-HPLC для 40°C (показаны в виде линейной диаграммы на фиг. 35C) в виде гистограммы, что делает сравнение уровней агрегации между составами более различимым.

На фиг. 36A-36F показаны диаграммы по данным СЕХ-HPLC для исследуемых составов, используемых в примере 9, на которых показаны изменения % кислотного и % основного пиков с течением времени после инкубации при 4°C (фигура 36A (% кислотного), фиг. 36B (% основного)), 25°C (фигура 36C (% кислотного), фиг. 36D (% основного)) и 40°C (фигура 36E (% кислотного), фиг. 36F (% основного)) вплоть до трех месяцев.

На фиг. 37A-37D показаны диаграммы по данным rCE-SDS для % главного пика и % LMW-разновидностей для исследуемых составов, используемых в примере 9, с течением времени после инкубации при 30°C (фиг. 37A (% главного пика), фиг. 37B (% LMW-разновидности)) и 40°C (фиг. 37C (% главного пика), фиг. 37D (% LMW-разновидностей)) вплоть до трех месяцев.

На фиг. 38A-38D показаны диаграммы по данным о числе частиц, невидимых невооруженным глазом, полученных путем подсчета частиц с помощью светоблокировки с применением НIАС, для исследуемых составов, используемых в примере 9, после инкубации при 4°C и 40°C в течение вплоть до трех месяцев. Фиг. 38A: НIАС -  $\geq 10$  мкм - 4°C; фиг. 38B: НIАС -  $\geq 25$  мкм - 4°C; фиг. 38C: НIАС -  $\geq 10$  мкм - 40°C; и НIАС -  $\geq 25$  мкм - 40°C.

### Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что производное аргинина, N-ацетиларгинин (NAR), эффективно снижает вязкость фармацевтических композиций, содержащих высокие концентрации (более 100 мг/мл, такие как 140 мг/мл и больше) эволокумаба, в большей степени, чем неацелированный аргинин. Фармацевтические композиции, характеризующиеся вязкостью, составляющей 50 сП или меньше, легко производить и вводить пациенту без значительных затруднений, в то время как с препаратами с более высокой вязкостью тяжело обращаться (например, при заполнении шприцев) и вводить. Хотя известно, что немодифицированный аргинин снижает вязкость составов с высокой концентрацией белков, только аргинина глутамат снижал вязкость сравнимого состава на основе эволокумаба (210 мг/мл), содержащего пролин, на 50 сП (с 159 сП до 109 сП), что значительно выше целевого значения, составляющего 50 сП или меньше. Более того, добавление аргинина моногидрохлорида (Arg-HCl) отдельно не приводило к достижению данной цели, снижая вязкость состава, содержащего пролин, с 159 сП до 70 сП. В то же время NAR привел к неожиданному эффекту дополнительного снижения вязкости до 58 сП - снижения на более 101 сП относительно состава, содержащего пролин, и при комбинировании с Arg-HCl (для повышения растворимости NAR и получения изотонического состава) привел к получению вязкости ниже 50 сП, при этом целевое значение было фактически превышено на 7 сП, поскольку состав характеризовался вязкостью, составляющей 43 сП. См. фиг. 2. Поскольку растворимость NAR ограничена значением, составляющим менее 230 мМ, чтобы получить изотонический состав для подкожного введения необходимо другое вспомогательное вещество. Неожиданным открытием стало то, что хлоридная соль аргинина является более эффективной в снижении вязкости эволокумаба, чем другие соли аргинина, такие как глутамат, что было крайне важно для сведения к минимуму вязкости состава.

Другим неожиданным открытием стали pH-зависимые влияния на стабильность и вязкость эволокумаба, наблюдаемые в присутствии NAR и аргинина-HCl. Значительное повышение скорости агрегации эволокумаба наблюдали при значении pH, составляющем менее 5,0, при повышенных температурах. Также pH-зависимое снижение вязкости наблюдали по мере повышения значения pH от pH 5, 1 до 6,9.

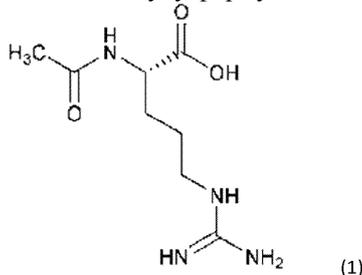
Авторы настоящего изобретения дополнительно обнаружили, что с помощью двухстадийного процесса ультрафильтрации/диализации (UF/DF) можно получать такие NAR-содержащие высококонцентрированные фармацевтические составы на основе эволокумаба при значительной экономии материала NAR по сравнению с традиционными одностадийными процессами. Такие способы обеспечивают значительное сокращение расходов, поскольку NAR в приблизительно десять раз дороже Arg-HCl.

#### Определения.

Как вышеприведенное общее описание, так и следующее подробное описание приведены только в качестве примера и разъяснения и не являются ограничивающими. Применение форм единственного числа предусматривает формы множественного числа, если специально не указано иное. Применение "или" означает "и/или", если не указано иное. Применение термина "включающий", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим. Такие термины как "элемент" или "компонент" охватывают как элементы и компоненты, содержащие одну единицу, так и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если конкретно не указано иное. Применение термина "часть" может предусматривать часть фрагмента или весь фрагмент. При упоминании числового диапазона, например, 1-5, явным образом подразумеваются все промежуточные значения, такие как 1, 2, 3, 4 и 5, а также их дробные значения, такие как 1, 5, 2,2, 3,4 и 4,1.

"Приблизительно" или "~" означают, в случае модификации количества (например, "приблизительно" 3 мМ), что могут происходить колебания вокруг модифицированного количества. Эти колебания могут быть связаны с множеством причин, таких как типичные процедуры измерения и обработки, неизбежные ошибки, чистота ингредиентов и т.п.

"N-ацетиларгинин" (NAR) обозначает молекулу формулы 1.



В контексте фармацевтической композиции "добавка" обозначает вещество, которое в естественном состоянии не является частью материала (например, лекарственной субстанции), а добавлено умышленно, чтобы выполнять какую-либо специфическую задачу (например, консервацию, снижение вязкости, стабилизацию).

"Аналог" относится к аминокислотной последовательности, которая содержит вставки, делеции или

замены относительно исходной последовательности, при этом она практически сохраняет биологическую активность исходной последовательности, как определено с применением биологических анализов. Аналоги включают полипептиды с модифицированным гликозилированием, полипептиды без гликозилирования. Составы также могут содержать производные встречающихся в природе полипептидов или их аналогов, которые были химически модифицированы, например, для присоединения водорастворимых полимеров (например, пегелированы), радионуклидов или других диагностических или нацеливающих или терапевтических фрагментов.

"Антитело" относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа и включает, например, химерные, гуманизированные, человеческие и биспецифические антитела. Интактное антитело, как правило, будет содержать по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи.

Последовательности антитела могут быть получены исключительно от одного вида или могут быть "химерными", то есть разные части антитела могут быть получены от двух разных видов. "Антитело" также включает антитела, содержащие две практически полноразмерные тяжелые цепи и две практически полноразмерные легкие цепи, при условии, что антитела сохраняют такое же или аналогичное связывание и/или функцию, как антитело, состоящее из двух полноразмерных легких и тяжелых цепей. Например, антитела, имеющие замены, вставки или делеции 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков на N-конце и/или C-конце тяжелой и/или легкой цепей, включены в определение при условии, что антитела сохраняют такое же или аналогичное связывание и/или функцию, как антитела, содержащие две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи. Антитела включают, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, биспецифические антитела и синтетические антитела.

Типичные структурные единицы антител предусматривают тетрамер. Каждый такой тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну полноразмерную "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи обычно содержит вариабельную область от приблизительно 100 до 110 или больше аминокислот, которая обычно отвечает за распознавание антигена.

Карбоксиконцевая часть каждой цепи обычно определяет константную область, которая может отвечать за эффекторную функцию. Легкие цепи обычно классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи обычно классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-, и они соответственно определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Антитела, представляющие собой IgG, имеют несколько подклассов, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включающие IgM1 и IgM2. IgA аналогичным образом подразделяется на подклассы, включающие IgA1 и IgA2. В пределах полноразмерных легкой и тяжелой цепей обычно вариабельные и константные области соединены областью "J", состоящей из приблизительно 12 или больше аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область "D", состоящую из приблизительно десяти или больше аминокислот. Вариабельные области каждой пары, состоящей из легкой/тяжелой цепей, обычно образуют антигенсвязывающий участок.

Вариабельные области обычно характеризуются одинаковой общей структурой относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. CDR из двух цепей каждой пары обычно выровнены по каркасным областям, что может обеспечивать связывание со специфическим эпитопом. От N-конца к C-концу вариабельные области как легкой, так и тяжелой цепей обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому домену обычно осуществляют в соответствии с определениями по Rabat (Rabat, Wu, Perry, Gottesman, & Foeller, 1991; Rabat, Wu, Reid-Miller, Perry, & Gottesman, 1987) или Chothia (Chothia & Lesk, 1987; Chothia et al., 1989).

Вместо полноразмерного антитела можно применять "фрагмент" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. "Фрагмент антитела" относится к фрагментам Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, которые содержат по меньшей мере одну CDR иммуноглобулина, достаточную для обеспечения специфического антигенного связывания с целевым белком, таким как PCSR9.

Тяжелая цепь антитела может связываться с антигеном в отсутствие легкой цепи антитела. Легкая цепь антитела может связываться с антигеном в отсутствие тяжелой цепи антитела. Связывающая область антитела может связываться с антигеном в отсутствие легкой цепи антитела. Связывающая область антитела может связываться с антигеном в отсутствие тяжелой цепи антитела. Отдельная вариабельная область может специфически связываться с антигеном в отсутствие других вариабельных областей.

Области CDR в тяжелой цепи обычно обозначаются как H1, H2 и H3 и пронумерованы последовательно в направлении от аминоконца к карбоксиконцу. Области CDR в легкой цепи обозначаются как L1, L2 и L3 и пронумерованы последовательно в направлении от аминоконца к карбоксиконцу.

Термин "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания.

Полноразмерная легкая цепь содержит домен вариабельной области, VL, и домен константной области, CL. Домен вариабельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкие це-

пи включают каппа-цепи и лямбда-цепи.

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность варибельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания.

Полноразмерная тяжелая цепь содержит домен варибельной области, VH, и три домена константной области, CH1, CH2 и CH3. Домен VH расположен на аминоконце полипептида, а домены CH расположены на карбоксильном конце, причем ближе всех к карбоксильному концу полипептида расположен CH3. Тяжелые цепи могут относиться к любому изотипу, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Каждая отдельная цепь иммуноглобулина обычно состоит из нескольких "доменов иммуноглобулина", каждый из которых состоит из примерно 90-110 аминокислот и имеет характерный паттерн фолдинга. Эти домены являются основными единицами полипептидов антител. У людей изотипы IgA и IgD содержат четыре тяжелые цепи и четыре легкие цепи; изотипы IgG и IgE содержат две тяжелые цепи и две легкие цепи, а изотип IgM содержит пять тяжелых цепей и пять легких цепей. С-область тяжелой цепи обычно содержит один или несколько доменов, которые могут отвечать за эффекторную функцию. Число доменов константной области тяжелой цепи зависит от изотипа. Например, тяжелые цепи IgG содержат три домена С-области, известные как CH1, CH2 и CH3. В определенных случаях антитело к PCSK9 относится к подтипу IgG1, или IgG2, или IgG4.

Термин "варибельная область" или "варибельный домен" относится к части легкой и/или тяжелой цепи антитела, обычно содержащей примерно 120-130 аминоконцевых аминокислот в тяжелой цепи и примерно 100-110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. Варибельная область антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени.

"Антиген" обозначает молекулу или часть молекулы, которая может связываться селективным связывающим средством, таким как PCSK9-связывающий полипептид (включая, например, антитело или его связывающий фрагмент). В некоторых случаях антиген можно применять у животного для получения антител, которые могут связываться с таким антигеном. Антиген может содержать один или несколько эпитопов, которые могут взаимодействовать с разными PCSK9-связывающими полипептидами.

"Аргининовая соль" обозначает соль аргинина. Примеры включают аргинина моногидрохлорид (Arg-HCl), аргинина ацетат (Arg ацетат) и аргинина глутамат (Arg глутамат).

"Буфер" обозначает любой фармацевтически приемлемый буфер, включая ацетатный, глутаматный, гистидиновый и фосфатный буферы и их соли.

"Конкурировать", при использовании в контексте антител, которые конкурируют за один и тот же эпитоп, обозначает конкуренцию между антителами, как определено с помощью анализа, в котором тестируемые антитела предотвращают или подавляют (например, уменьшают) специфическое связывание эталонного антитела (например, лиганда или эталонного антитела) с общим антигеном (например, PCSK9 или его фрагментом). Для определения того, конкурирует ли одно антитело с другим, можно применять множество типов конкурентных анализов связывания, например: твердофазный прямой или опосредованный иммунные анализы с применением целого ряда принятых в области техники реагентов и меток. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антитела. Обычно тестируемое антитело присутствует в избытке. Антитела, идентифицируемые с помощью конкурентного анализа, включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с прилегающим эпитопом, достаточно близким к эпитопу, который связывает эталонное антитело, чтобы возникло стерическое затруднение. Чаще всего, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет подавлять (например, уменьшать) специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном на по меньшей мере 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% или больше. В некоторых случаях связывание подавляется на по меньшей мере 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, или 97% или больше.

"Диафильтрация", "DF" и подобные термины означают применение мембраны для ультрафильтрации (т.е. полупроницаемой мембраны, которая может различать молекулы разных форм и размеров) для удаления, замещения или снижения концентрации солей или растворителей в растворах или смесях, содержащих, например, полипептиды или другие биомолекулы.

В контексте фильтрации "диаобъем (DV)" обозначает объем буфера для диафильтрации, вводимого в типовой процесс, относительно объема концентрата.

"Эпитоп" предусматривает любую детерминанту, которую может связывать PCSK9-связывающий полипептид, такой как антитело. Эпитоп представляет собой область антигена, которую связывает PCSK9-связывающий полипептид, который нацеливается на такой антиген, и, когда антиген представляет собой белок, содержит специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с PCSK9-связывающим полипептидом. Эпитопы, представляющие собой детерминанты, могут содержать химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы и сульфонильные группы, и могут обладать специфическими трехмерными структурными характеристиками и специфическими характеристиками заряда. В целом, антитела, специфические в отношении конкретного антигена-мишени, предпочтительно распознают эпитоп на анти-

гене-мишени в сложной смеси из белков или других макромолекул.

"Вспомогательное вещество" обозначает более или менее инертное вещество, добавляемое рецептуру в качестве разбавителя или среды-носителя или для получения вида или консистенции, если лекарство вводят в форме пилюли; например, сахарный сироп, растительные камеди, ароматические порошки, мед и различные настойки.

"Поперечный поток подачи" обозначает скорость потока подачи (л/час), деленную на площадь мембраны ( $m^2$ ).

В контексте фильтрации "поток (LMH)" обозначает литры в час на квадратный метр площади мембраны (л/ч/ $m^2$ ).

В контексте фармацевтического состава, содержащего терапевтический полипептид, "высокомолекулярные разновидности" или "HMW-разновидности" обозначают терапевтические белки, которые крупнее оригинального терапевтического полипептида, как определено с помощью анализов, принятых в данной области техники. HMW-разновидности включают олигомеры терапевтических полипептидов и агрегаты терапевтических полипептидов.

В контексте фильтрации "перепускной объем (HUV)" обозначает объем продукта в трубопроводе системы TFF, включая объем, находящийся в картридже.

"Идентичность" относится к взаимосвязи между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или более молекул нуклеиновой кислоты, как определено при выравнивании и сравнении последовательностей. "Процент идентичности" обозначает процент идентичных остатков аминокислот или нуклеотидов в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основании размера наименьшей из молекул, подлежащих сравнению. В этих расчетах гэпы в выравниваниях (если таковые имеются) предпочтительно учитываются с помощью конкретной математической модели или алгоритма. Такие методики хорошо известны из уровня техники.

При расчете процента идентичности подлежащие сравнению последовательности обычно выравнивают для максимального увеличения наибольшего совпадения между последовательностями.

Применение определенных схем выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей может приводить к совпадению короткой области в данных двух последовательностях, и данная небольшая выровненная область может характеризоваться очень высокой идентичностью последовательности, даже если значительная взаимосвязь между двумя полноразмерными последовательностями отсутствует. Соответственно, выбранный способ выравнивания может быть скорректирован, если требуется, чтобы он приводил к выравниванию, которое охватывает требуемое число смежных аминокислот (например, 50 аминокислот) целевого полипептида.

Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати традиционных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как  $\alpha$ -,  $\alpha$ -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты также могут представлять собой подходящие компоненты для PCSK9-связывающих полипептидов. Примеры нетрадиционных аминокислот включают 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N,N,N-триметиллизин,  $\epsilon$ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин,  $\sigma$ -N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин).

Консервативные аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые обычно вводятся посредством химического пептидного синтеза, а не посредством синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных фрагментов.

При внесении изменений в антигенсвязывающий белок или белок PCSK9 можно учитывать индекс гидрофобности аминокислот. Каждой аминокислоте присвоен индекс гидрофобности на основании ее гидрофобности и характеристик заряда. Важность индекса гидрофобности аминокислоты в придании белку биологической функции взаимодействия является очевидной в данной области техники. Определенные аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты, характеризующиеся аналогичным индексом или показателем гидрофобности, и при этом белки сохраняют аналогичную биологическую активность.

Замену подобных аминокислот можно выполнять эффективно на основании гидрофильности. На основании гидрофильности также можно идентифицировать эпитопы в первичных аминокислотных последовательностях. Такие области также называют "коровыми областями эпитопа".

В контексте фармацевтического состава, содержащего терапевтический полипептид, "низкомолекулярные разновидности" или "LMW-разновидности" обозначают полипептиды, которые меньше оригинального терапевтического полипептида, как определено с помощью анализов, принятых в данной области техники. LMW-разновидности включают фрагменты терапевтического полипептида.

"Нейтрализующее антитело" или "антитело, которое нейтрализует мишень", используемое в выражении "нейтрализующее антитело к PCSK9", относится к антителу, которое связывается с мишенью и предотвращает или уменьшает биологическую активность такой мишени. Это может осуществляться, например, за счет прямой блокировки участка связывания на мишени или за счет связывания с мишенью

и изменения способности мишени к связыванию с помощью непрямых механизмов, таких как структурные или энергетические изменения в мишени. При проведении оценки связывания и/или специфичности антитела или его иммунологически функционального фрагмента антитело или фрагмент могут практически подавлять связывание мишени с ее партнером по связыванию, когда избыток антитела уменьшает количество партнера по связыванию, связавшегося с лигандом, на по меньшей мере приблизительно 1-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-98%, 98-99% или больше (как измерено в анализе конкурентного связывания *in vitro*). В случае антител к PCSK9 такая нейтрализующая молекула может снижать способность PCSK9 связывать LDLR. В некоторых случаях нейтрализующую способность характеризуют или описывают с помощью конкурентного анализа. В некоторых случаях антитела обеспечивают нейтрализацию за счет связывания с PCSK9 и предотвращения связывания PCSK9 с LDLR или за счет снижения способности PCSK9 связываться с LDLR. В некоторых случаях антитела обеспечивают нейтрализацию за счет связывания с PCSK9, при этом хотя и остается возмужение связывания PCSK9 с LDLR, предотвращается или уменьшается опосредованное PCSK9 разрушение LDLR. Таким образом, в некоторых случаях в присутствии нейтрализующего антитела все еще возможно связывание PCSK9/LDLR, но предотвращается или уменьшается последующее обусловленное PCSK9 разрушение LDLR. Нейтрализация приводит к снижению уровня LDL-C (и/или других липидов, таких как ApoB, Lp(a) и т.д.). PCSK9-связывающие полипептиды, не относящиеся к антителам, включая варианты таких PCSK-связывающих полипептидов, могут характеризоваться такими же активностями.

"PCSK9-связывающий полипептид" обозначает полипептид, который связывает белок пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9). В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид блокирует связывание PCSK9 с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LDLR). Такие блокирующие PCSK9-связывающие полипептиды могут представлять собой моноклональные антитела (mAb) и могут представлять собой одно из следующего:

a) mAb, содержащее полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающий фрагмент;

b) mAb, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

c) mAb, содержащее:

i) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

ii) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

d) mAb, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

e) mAb, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

i) переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

ii) переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

iii) где эпитоп mAb дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен повтора А подобного эпидермальному фактору роста (EGF-A) из LDLR; или

f) mAb, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR):

i) CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и

ii) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

Указанные аминокислотные последовательности представлены в табл. 1, в которой также представлены переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи эволокумаба. Полноразмерные нуклеотидные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи эволокумаба приведены в табл. 2, также как и нуклеотидные последовательности HCVR и LCVR эволокумаба.

Таблица 1

Последовательности PCSK9 и PCSK9-связывающего полипептида

Последовательность HC эволокумаба (USAN; SEQ ID NO:1)

EVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTLT	SYGISWVRQA	PGQGLEWMGW
VSFYNGNTNY	60			
AQKLQGRGTM	TTDPSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARGY	GMDVWGQGT
VTVSSASTKG	120			
PSVFPLAPCS	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFFA
VLQSSGLYSL	180			
SSVVTVPSSN	FGTQYTCNV	DHKPSNTKVD	KTVRKCCVE	CPPCPAPPVA
GPSVFLFPPK	240			
PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVQFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF
NSTFRVSVL	300			
TVVHQDLNG	KEYKCKVSNK	GLPAPIEKTI	SKTKGQPREP	QVYTLPPSRE
EMTKNQVSLT	360			
CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTPP	MLDSDGSEFFL	YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS	420			
VMHEALHNNY	TQKSLSLSPG	K	441	

Последовательность LC эволокумаба (USAN; SEQ ID NO:2)

ESALTQFASV	SGSPGQSITI	SCTGTSSDVG	GYNSVSWYQQ	HPGKAPKLM
YEVSNRPSGV	60			
SNRFGSKSG	NTASLTISGL	QAEDEADYYC	NSYTSTSMVF	GGGKLTVLG
QPKAAPSVTL	120			
FPPSSEELQA	NKATLVCLIS	DFYPGAVTVA	WKADSSPVKA	GVETTTPSKQ
SNNKYAASSY	180			
LSLTPEQWKS	HRSYSCQVTH	EGSTVEKTVA	PTECS	215

Препротеин PCSK9 (человека; SEQ ID NO:3)

MGTVSSRRSW	WPLPLLLLLL	LLGPAGARA	QEDEDGDYEE	LVLALRSEED
------------	------------	-----------	------------	------------

045816

GLAEAPEHGT 60  
TATFHRC AKD PWRLPGTYVV VLKEETHLSQ SERTARRLQA QAARRGYLTK  
ILHVFHGLLP 120  
GFLVKMSGDL LELALKLPHV DYIEEDSSVF AQSIPWNLER ITPPRYRADE  
YQPPDGGSLV 180  
EVYLLDTSIQ SDHREIEGRV MVTDFENVPE EDGTRFHRQA SKCDSHGTHL  
AGVVSGRDAG 240  
VAKGASMRSL RVLNCQGKGT VSGTLIGLEF IRKSQLVQPV GPLVLLPLA  
GGYSRVLNAA 300  
CQRLARAGVV LVTAAGNFRD DACLYSPASA FEVITVGATN AQDQPVTLGT  
LGTNFGRCVD 360  
LFAPGEDIIG ASSDCSTCFV SQSGTSQAAA HVAGIAAMML SAEPELTLAE  
LRQLIHFS A 420  
KDVINEAWFP EDQRVLT PNL VAALPPSTHG AGWQLFCRTV WSAHSGPTRM  
ATAIARCAPD 480  
EELLSCSSFS RSGKRRGERM EAQGGKLVCR AHNAFGGEGV YAIARCCLLP  
QANCSVHTAP 540  
PAEASMGTRV HCHQQGHVLT GCSSHWEVED LGTHKPPVLR PRGQPNQCVG  
HREASIHASC 600  
CHAPGLECKV KEHGIPAPQG QVTVACEEGW TLTGCSALPG TSHVLGAYAV  
DNTCVVRSRD 660  
VSTTGSTSEE AVTAVAICCR SRHLAQASQE LQ 692  
Последовательность HCVR эволюкумаба (SEQ ID NO:14)  
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTLT SYGISWVRQA PGQGLEWMGW  
VSFYNGNTNY 60  
AQKLQGRGTM TTDPTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARGY GMDVWGQGT VTVSS  
115  
Последовательность LCVR эволюкумаба (SEQ ID NO:15)  
QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNSVSWYQQ HPGKAPKLM I  
YEVSNRPSGV 60  
SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC NSYTSTSMVF GGGTKLTVL 109  
CDR1 LC (SEQ ID NO:4)  
TGTSSDVG GY NSVS 14  
CDR2 LC (SEQ ID NO:5)  
EVSNRPS 7  
CDR3 LC (SEQ ID NO:6)  
NSYTSTSMV 9  
CDR1 HC (SEQ ID NO:7)  
GYTLTSYGIS 10  
CDR2 HC (SEQ ID NO:8)  
WVSFYNGNTN YAQKLQ 16  
CDR3 HC (SEQ ID NO:9)  
GYGMDV 6

Таблица 2

## Полинуклеотидные последовательности эволюкумаба

Последовательность НС эволюкумаба (SEQ ID NO:12) (обратите внимание, что нуклеотиды 1-57 кодируют нативный сигнальный пептид)

atggactgga	cctggaggat	ccttttcttg	gtggcagcag	ccacaggtgt
ссactccgag	60			
gttcagctgg	tgcagtctgg	agctgaggtg	aagaagcctg	ggcctcagt
gaaggtctcc	120			
tgcaaggctt	ctggttacac	cttaaccagc	tatggtatca	gctgggtgcg
acaggcccct	180			
ggacaagggc	ttgagtggat	gggatgggtc	agtttttata	atggtaacac
aaactatgca	240			
cagaagctcc	agggcagagg	caccatgacc	acagacccat	ccacgagcac
agcctacatg	300			
gagctgagga	gcctgagatc	tgacgacacg	gccgtgtatt	actgtgagag
aggctacggt	360			
atggacgtct	ggggccaagg	gaccacggtc	accgtctcct	ctgcctccac
caagggccca	420			
tcggtcttcc	ccctggcgcc	ctgctccagg	agcacctccg	agagcacagc
ggcctgggc	480			
tgcttggtca	aggactactt	ccccgaaccg	gtgacggtgt	cgtggaactc
aggcgctctg	540			
accagcggcg	tgcacacctt	cccagctgtc	ctacagtctt	caggactcta
ctccctcagc	600			
agcgtggtga	ccgtgccctc	cagcaacttc	ggcaccacaga	cctacacctg
caacgtagat	660			

045816

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag acagttgagc gcaaatggtg  
tgtcagtgcc 720  
ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga ccgtcagtct tcctcttccc  
cccaaaacc 780  
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacgt gcgtggtggt  
ggacgtgagc 840  
cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt  
gcataatgcc 900  
aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac agcacgttcc gtgtggtcag  
cgtcctcacc 960  
gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc  
caacaaaggc 1020  
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag ggcagccccg  
agaaccacag 1080  
gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag  
cctgacctgc 1140  
ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa  
tgggcagccg 1200  
gagaacaact acaagaccac acctcccatg ctggactccg acggctcctt  
cttctcttac 1260  
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc  
atgctccgtg 1320  
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc  
tccgggtaaa 1380  
Последовательность LC эволюкумаба (SEQ ID NO:13)  
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgtgtggct  
gagaggtgcc 60  
agatgtgagt ctgccctgac tcagcctgcc tccgtgtctg ggtctcctgg  
acagtcgata 120  
accatctcct gcaactggaac cagcagtgac gttggtggtt ataactctgt  
ctcctggtac 180  
caacagcacc caggcaaagc ccccaaacct atgatttatg aggtcagtaa  
tcggccctca 240  
ggggtttcta atcgcttctc tggtccaag tctggcaaca cggcctcct  
gaccatctct 300

**045816**

```

gggctccagg ctgaggacga ggctgattat tactgcaatt catatacaag
caccagcatg 360
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc
cccctcggtc 420
actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact
ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag
cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta
cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag
ctqccaqgtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 711
Последовательность HCVR эволюкумаба (SEQ ID NO:10)
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc
agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggtta caccttaacc agctatggta tcagctgggt
gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg gtcagttttt ataatggtaa
cacaactat 180
gcacagaagc tccagggcag aggcaccatg accacagacc catccacgag
cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc
gagaggctac 300
ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctct 345
Последовательность LCVR эволюкумаба (SEQ ID NO:11)
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc
gatcaccatc 60
tcctgcaactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact ctgtctctg
gtaccaacag 120
caccagcga aagcccccaa actcatgatt tatgaggcca gtaatcggcc
ctcaggggtt 180
tctaactgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgacat
ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc aattcatata caagcaccag
catggtattc 300
ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

```

Эволюкумаб имеет регистрационный номер CAS 1256937-27-5. Вариант эволюкумаба, у которого не изменены его PCSK9-связывающие и ингибирующие свойства, показан в табл. 3.

**Таблица 3**

**Последовательности HCVR и LCVR варианта эволюкумаба**

```

Последовательность HCVR варианта эволюкумаба (SEQ ID NO:16)
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTLT SYGISWVRQA PGQGLEWMGW
VSFYNGNTNY 60
AQLKQGRGTM TDPSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARGY GMDVWGQGT VTVSS
115
Последовательность LC варианта эволюкумаба (SEQ ID NO:17)
QSALTQPASV SGSPQSITI SCTGTSSDVG GYNSVSWYQQ HPGKAPKLMI
YEVSNRPSGV 60
SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC NSYTSTSMVF GGGTKLTVL 109

```

"Фармацевтическая композиция" или "фармацевтический состав" и т.п. обозначает композицию, обычно стерильную, фармацевтически активного лекарственного средства, такого как биологически ак-

тивный белок (например, PCSK9-связывающий полипептид), которая подходит для введения, такого как парентеральное введение (включая внутривенное, внутримышечное, подкожное, аэрозольное, внутривлагалищное, интраназальное или интратекальное), субъекту, нуждающемуся в этом, и она содержит только фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, разбавители и другие добавки, признаваемые безопасными Федеральным управлением по лекарственным средствам или другими иностранными национальными контролирующими органами.

Фармацевтические составы включают жидкости, например, водные растворы, которые могут вводиться непосредственно, и лиофилизированные порошки, которые могут быть восстановлены в растворы за счет добавления разбавителя перед введением.

"Полипептид" или "белок" обозначает макромолекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного белка, то есть белка, продуцируемого встречающейся в природе и нерекombинантной клеткой; или продуцируемого генетически сконструированной или рекомбинантной клеткой, и предусматривает молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, добавления и/или замены одной или нескольких аминокислот в нативной последовательности. Термин также включает полимеры из аминокислот, в которых одна или несколько аминокислот являются химическими аналогами соответствующих встречающихся в природе аминокислоты и полимеров. "Фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который имеет делецию на аминоконце, делецию на карбоксильном конце и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным нативным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с нативным белком. Длина фрагментов может составлять от приблизительно пяти до 500 аминокислот. Например, длина фрагментов может составлять по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Применимые фрагменты полипептидов включают иммунологически функциональные фрагменты антител, включая связывающие домены. В случае PCSK9-связывающего антитела применимые фрагменты включают без ограничения область CDR, варибельный домен тяжелой и/или легкой цепи, часть цепи антитела или только ее варибельную область, содержащую две CDR.

Для "предупреждения" (например, проявления симптомов, заболевания или нарушения) не требуется устранение возможности возникновения явления. Это, скорее, означает, что вероятность возникновения явления была снижена в присутствии соединения или способа. "Предупреждение" в терапевтическом смысле предусматривает виды профилактического лечения и пути применения, при которых снижается риск того, что у субъекта разовьется нарушение или другой фактор риска.

"Стабильный фармацевтический состав", "стабильный состав" или "фармацевтический состав является стабильным" относятся к фармацевтическому составу на основе PCSK9-связывающих полипептидов, который проявляет ограниченное повышение агрегации и/или сниженную утрату биологической активности, составляющие не более 5%, если хранится при температуре от приблизительно -30°C (или ниже) до приблизительно 5°C до приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца, или 2 месяцев, или три месяцев, или 6 месяцев, или 1 года, или 2 лет, или 5 лет, или дольше по сравнению с образцом контрольного состава. Стабильность состава может определить специалист в данной области техники с применением любого числа стандартных анализов, включая эксклюзионную HPLC (SEC-HPLC), катионообменную HPLC (CEX-HPLC), обнаружение частиц, невидимых невооруженным глазом, с помощью светоблокировки ("НІАС") и/или визуальный осмотр. Обычно, чем выше температура при хранении, тем меньше срок хранения состава.

Методики оценки разрушения варьируются в зависимости от природы белка в фармацевтическом составе. Иллюстративные методики включают эксклюзионную хроматографию (SEC)-HPLC для обнаружения, например, агрегации, обращенно-фазовую (RP)-HPLC для обнаружения, например, фрагментации белка, ионообменную HPLC для обнаружения, например, изменения заряда белка, масс-спектрометрию, флуоресцентную спектроскопию, спектроскопию кругового дихроизма (CD), инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (FT-IR) и рамановскую спектроскопию для обнаружения конформационных изменений белка. Все эти методики можно применять по отдельности или в комбинации для оценки разрушения белка в фармацевтическом составе и определения срока хранения такого состава. Фармацевтические составы, раскрытые в данном документе, обычно проявляют увеличение разрушения (например, фрагментацию, агрегацию или разворачивание), составляющее не более чем от приблизительно 2% до приблизительно 3%, за два года при хранении при 2-8°C.

"Субъект" или "пациент" используются взаимозаменяемо и включают субъектов-людей и субъектов-животных, отличных от человека, а также субъектов с официально диагностированными нарушениями, субъектов без официально признаваемых нарушений, субъектов, получающих медицинскую помощь, и субъектов с риском развития нарушений.

"Поверхностно-активное вещество" обозначает поверхностно-активное средство, включая вещества, обычно называемые смачивающими средствами, вещества, уменьшающие поверхностное натяжение, детергенты, диспергирующие средства, эмульгаторы и антисептические вещества на основе четвертичного аммония. Поверхностно-активные вещества дополнительно обсуждаются ниже.

"Фильтрация в тангенциальном потоке" или "TFF" обозначает процесс, при котором раствор прохо-

дит тангенциально вдоль мембраны для ультрафильтрации (т.е. полупроницаемой мембраны, которая может различать молекулы разных форм и размеров), при этом соли и/или растворенные вещества с более низкой молекулярной массой проходят через нее под давлением.

"Терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству полипептида, связывающего антиген PCSK9, которое, как определено, приводит к терапевтическому ответу у субъекта. Такие терапевтически эффективные количества могут быть легко установлены средним специалистом в данной области.

В контексте фильтрации "трансмембранное давление (TMP)" обозначает среднюю разность давлений на стороне подачи и на стороне фильтрата мембраны и его можно выразить с помощью уравнения (1):

$$\text{TMP} = \frac{\text{давление подачи} + \text{давление концентрата}}{2} - \text{давление фильтрата}$$

(Уравнение (1))

"Лечить" и обеспечивать "лечение" включают обеспечение видов терапевтического лечения. Лечение не требует полного излечения нарушения и охватывает случаи, при которых уменьшаются симптомы или лежащие в основе факторы риска.

"Ультрафильтрация", "осуществление ультрафильтрации", "UF" и аналогичные термины обозначают применение полупроницаемой мембраны, которая различает молекулы разных форм и размеров с отделением молекул от других молекул или с концентрированием подобных или практически одинаковых молекул.

"Вариант" PCSK9-связывающего полипептида обозначает аминокислотную последовательность, где один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности вставлены, удалены и/или заменены по сравнению с другой полипептидной последовательностью. Варианты включают слитые белки.

"Вязкость" обозначает сопротивление жидкости перемещению и ее можно измерять в единицах сантипуаз (сП) или миллипаскаль-секунд (мПа·с), где 1 сП=1 мПа·с при заданной скорости сдвига. Вязкость можно измерять с применением вискозиметра, например, аналогового вискозиметра от Brookfield Engineering (Миддлборо, Массачусетс), или реометра, такого как реометр m-VROC™, или реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр). Вязкость можно измерять с применением любых других способов и в любых других единицах, известных в области техники (например, абсолютную, кинематическую или динамическую вязкость). Независимо от способа, применяемого для определения вязкости, процент уменьшения вязкости в составах со вспомогательным веществом в сравнении с контрольными составами будет оставаться примерно одинаковым при заданной скорости сдвига.

Компоненты композиций и способы PCSK9-связывающие полипептиды PCSK9-связывающие полипептиды, включая эволюкумаб, были хорошо описаны (Chan et al., 2012).

Пропотеиновая конвертаза субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) представляет собой сериновую протеазу, вовлеченную в регуляцию уровней белка рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) (Horton, Cohen, & Hobbs, 2007; Seidah & Prat, 2007). PCSK9 представляет собой прогормон-пропротеиновую конвертазу в субтилизиновом (S8) семействе сериновых протеаз (Seidah et al., 2003). Иллюстративная аминокислотная последовательность PCSK9 человека показана под SEQ ID NO: 3 в табл. 1, которая представляет собой форму белка-предшественника (непроцессированного) PCSK9. Белки PCSK9 также могут включать фрагменты полноразмерного белка PCSK9. Структура белка PCSK9 была раскрыта (Cunningham et al., 2007; Piper et al., 2007). PCSK9 содержит сигнальную последовательность, N-концевой продомен, субтилизин-подобный каталитический домен и C-концевой домен.

PCSK9-связывающие полипептиды представляют собой полипептиды, которые содержат одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR). В некоторых PCSK9-связывающих полипептидах CDR встроены в каркасную область, которая ориентирует CDR таким образом, что у CDR обеспечиваются надлежащие свойства связывания PCSK9. PCSK9-связывающие полипептиды могут препятствовать, блокировать, снижать или модулировать взаимодействие между PCSK9 и LDLR. Такие PCSK9-связывающие полипептиды обозначаются как "нейтрализующие". Тем не менее, связывание между PCSK9 и LDLR может происходить даже несмотря на то, что PCSK9-связывающий полипептид является нейтрализующим и связавшимся с PCSK9. Например, PCSK9-связывающий полипептид предотвращает или уменьшает неблагоприятное воздействие PCSK9 на LDLR без блокирования участка связывания LDLR на PCSK9. Таким образом, PCSK9-связывающий полипептид может модулировать или изменять способность PCSK9 разрушать LDLR, не предотвращая связывание между PCSK9 и LDLR. Такие PCSK9-связывающие полипептиды можно описать как "нейтрализующие неконкурентным образом".

Нейтрализующий PCSK9-связывающий полипептид может связываться с PCSK9 в местоположении или способом, которые предотвращают связывание PCSK9 с LDLR. Такие PCSK9-связывающие полипептиды можно описать как "нейтрализующие конкурентным образом". Средства, нейтрализующие PCSK9, могут приводить к тому, что большее количество свободного LDLR присутствует у субъекта, что приводит к большей степени связывания LDLR с LDL и, тем самым, уменьшает количество LDL у субъекта.

екта. В свою очередь, это приводит к уменьшению количества холестерина, присутствующего в сыворотке крови субъекта.

Некоторые PCSK9-связывающие полипептиды могут подавлять опосредованную PCSK9 активность (включая связывание). PCSK9-связывающие полипептиды также могут подавлять взаимодействия между PCSK9 и LDLR и другие физиологические эффекты, опосредуемые PCSK9. PCSK9-связывающие полипептиды могут представлять собой человеческие, такие как полностью человеческие, антитела к PCSK9.

Некоторые PCSK9-связывающие полипептиды могут связываться с каталитическим доменом PCSK9. PCSK9-связывающие полипептиды также могут связываться со зрелой формой PCSK9. В других случаях PCSK9-связывающие полипептиды могут связывать продомен PCSK9. В некоторых случаях PCSK9-связывающие полипептиды могут селективно связываться со зрелой формой PCSK9. В некоторых случаях PCSK9-связывающие белки связываются с каталитическим доменом таким образом, что PCSK9 не может связаться или связаться настолько же эффективно с LDLR. Некоторые PCSK9-связывающие полипептиды не связываются с C-концом каталитического домена. В других случаях PCSK9-связывающий полипептид не связывается с N-концом каталитического домена. В других случаях PCSK9-связывающий полипептид не связывается с N- или C-концом белка PCSK9. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид связывается с любым из эпитопов, которые связывают антитела к PCSK9. В некоторых случаях это можно определять с помощью анализов конкурентного связывания, проводимых с антителом-кандидатом и эталонным антителом, таким как эволюкумаб. В некоторых случаях PCSK9-связывающие полипептиды связываются с PCSK9 со специфической конформационной структурой таким образом, чтобы предотвратить взаимодействие PCSK9 с LDLR. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид связывается с V-доменом PCSK9. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид связывается с V-доменом PCSK9 и предотвращает (или уменьшает) связывание PCSK9 с LDLR. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид связывается с V-доменом PCSK9, и несмотря на то, что он не предотвращает (или уменьшает) связывание PCSK9 с LDLR, PCSK9-связывающий полипептид предотвращает или уменьшает неблагоприятные виды активности, опосредованные воздействием PCSK9 на LDLR.

В некоторых случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат одну или несколько CDR (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR). В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид содержит (а) полипептидную структуру и (б) одну или несколько CDR, которые вставлены в полипептидную структуру и/или соединены с ней. Полипептидная структура может принимать целый ряд различных форм. Например, она может представлять собой или содержать каркасную область встречающегося в природе антитела или его фрагмента или варианта, или может быть синтетической.

Полипептидная структура PCSK9-связывающих полипептидов может представлять собой антитело или получена из антитела, включая моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (антитела-миметики), химерные антитела, гуманизированные антитела, слитые антитела (иногда называемые "конъюгатами на основе антител") и части или фрагменты каждого из них соответственно. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид представляет собой фрагмент антитела (например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или scFv).

Определенные PCSK9-связывающие полипептиды специфически или селективно связываются с PCSK9 человека. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид специфически или селективно связывается с белком PCSK9 человека, имеющим или состоящим из остатков 153-692 из SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид специфически связывается с по меньшей мере фрагментом белка PCSK9 и/или полноразмерным белком PCSK9 с сигнальной последовательностью или без нее.

В некоторых случаях антитела содержат по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи и одну переменную область легкой цепи. В других случаях антитела содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи. В качестве примера, антитело или PCSK9-связывающий полипептид могут содержать тяжелую цепь и легкую цепь, две тяжелые цепи или две легкие цепи. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид содержит (или состоит из) 1, 2 и/или 3 CDR тяжелой и/или легкой цепей из по меньшей мере одной из последовательностей (SEQ ID NO: 4-9), перечисленных в табл. 1. В некоторых случаях все шесть CDR (CDR1-3 из легкой цепи (CDRL1, CDRL2, CDRL3) и CDR1-3 из тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3)) являются частью PCSK9-связывающего полипептида. В некоторых случаях 1, 2, 3, 4, 5 или больше CDR содержатся в PCSK9-связывающем полипептиде. В некоторых случаях одна CDR тяжелой цепи и одна CDR легкой цепи из CDR в последовательностях в таблице 1 содержатся в PCSK9-связывающем полипептиде. В некоторых случаях дополнительные участки содержатся в PCSK9-связывающем полипептиде.

PCSK9-связывающий полипептид может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной в табл. 2 для эволюкумаба.

В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид связывается с (но не блокирует) вариантами PCSK9, которые на по меньшей мере 50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 процентов идентичны или характеризуются большим процентом идентичности с PCSK9 под SEQ ID NO: 3. В некоторых случа-

ях PCSK9-связывающий полипептид связывается с (но не блокирует) такими вариантами. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид связывается с такими вариантами PCSK9 и предотвращает их взаимодействие с LDLR. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид связывается с вариантами PCSK9 и предотвращает их взаимодействие с LDLR. В некоторых случаях вариант PCSK9 представляет собой вариант белка человека, такой как варианты по положению 474, E620G и/или E670G. В некоторых случаях аминокислота в положении 474 представляет собой валин.

Гуманизированные PCSK9-связывающие полипептиды (например, антитела).

PCSK9-связывающий полипептид может предусматривать гуманизированное антитело и/или его часть.

Гуманизированное антитело является практически неиммуногенным для людей и характеризуется практически такой же аффинностью в отношении мишени, что и антитело, принадлежащее другому виду, от которого получено гуманизированное антитело.

Можно разрабатывать модификацию антитела для обеспечения повышенной аффинности связывания в отношении мишени и/или для уменьшения иммуногенности антитела у реципиента. В определенных случаях гуманизированные антитела модифицируют для устранения участков гликозилирования, чтобы повысить аффинность антитела в отношении распознаваемого им антигена. Для получения гуманизированных антител можно применять такие методики, как "реконструирование", "гиперхимеризация" или "венирование/изменение поверхности". Такие методики обычно уменьшают иммуногенность антитела путем уменьшения числа чужеродных остатков, но не предотвращают антиидиотипические и антиалотипические реакции после повторного введения антитела. Из уровня техники известны другие способы уменьшения иммуногенности.

CDR переменных областей легкой и тяжелой цепей антитела к PCSK9 могут быть привиты на каркасные области (FR) из антитела, принадлежащего тому же или другому виду. CDR переменных областей легкой и тяжелой цепей могут быть привиты на консенсусные человеческие FR. В некоторых случаях FR из тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PCSK9 могут быть замещены на FR из другой тяжелой цепи или легкой цепи. Привитые переменные области из антитела можно применять с константной областью, которая отличается от константной области антитела к PCSK9. Привитые переменные области могут быть частью одноцепочечного антитела Fv.

Варианты PCSK9-связывающего полипептида.

Другие антитела, которые являются применимыми, представляют собой варианты перечисленных выше PCSK9-связывающих полипептидов, образованные за счет комбинации переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, показанных в табл. 1, или их компонентов, и содержащие переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, каждая из которых характеризуется по меньшей мере 50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-99%, или более 99% идентичностью с аминокислотными последовательностями из последовательностей в табл. 1 (либо целой последовательностью, либо компонентом последовательности, например, одной или несколькими CDR). В некоторых случаях такие антитела содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, тогда как в других случаях вариантыные формы содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи (или их компоненты).

В определенных случаях PCSK9-связывающий полипептид содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область, содержащую аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95% или на по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1.

В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 90-95% и/или 95-99% идентична одной или нескольким CDR из CDR в по меньшей мере одной из последовательностей под SEQ ID NO: 4-9. В некоторых случаях присутствует 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR (каждая из них на по меньшей мере 90%, 90-95% и/или 95-99% идентична вышеприведенным последовательностям).

В определенных случаях PCSK9-связывающий полипептид содержит легкую цепь, содержащую переменную область, содержащую аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95% или на по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11 или 15.

В других случаях PCSK9-связывающий полипептид содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область, содержащую аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95% или на по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 10 или 14.

Специалист в данной области может определять подходящие варианты PCSK9-связывающих полипептидов с применением хорошо известных методик. В определенных случаях специалист в данной области техники может идентифицировать подходящие зоны молекулы, которые можно изменять, не нарушая ее активность, за счет нацеливания на области, которые не считаются важными для активности. В определенных случаях можно идентифицировать остатки и части молекул, которые являются консервативными у подобных полипептидов. В определенных случаях даже зоны, которые могут быть важны для

биологической активности или для структуры, могут быть подвергнуты консервативным аминокислотным заменам, не нарушая биологическую активность или не воздействуя неблагоприятным образом на структуру полипептида.

Кроме того, специалист в данной области техники может просмотреть исследования структурно-функциональных свойств, идентифицирующие в подобных полипептидах остатки, которые являются важными для активности или структуры. С учетом такого сравнения можно предсказать важность в белке аминокислотных остатков, которые соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются важными для активности или структуры в подобных белках.

Специалист в данной области техники может остановить выбор на химически подобных аминокислотных заменах в случае таких предсказанных важных аминокислотных остатков.

Специалист в данной области техники также может анализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность в связи с такой структурой у подобных PCSK9-связывающих полипептидов. С учетом такой информации специалист в данной области техники может предсказать выравнивание аминокислотных остатков антитела, принимая во внимание его трехмерную структуру. В определенных случаях специалист в данной области техники может принять решение не вносить радикальные изменения в аминокислотные остатки, которые предположительно находятся на поверхности белка, поскольку такие остатки могут участвовать в важных взаимодействиях с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области техники может создавать тестовые варианты, содержащие одну аминокислотную замену в каждом требуемом аминокислотном остатке. Затем варианты можно подвергнуть скринингу с применением анализов активности, известных из уровня техники. Такие варианты можно применять для сбора информации о подходящих вариантах. Например, если наблюдают, что изменение конкретного аминокислотного остатка привело к нарушенной, нежелательным образом сниженной или неподходящей активности, вариантов с таким изменением можно избегать. Другими словами, на основе информации, собранной в таких стандартных экспериментах, специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, в которых следует избегать дополнительных замен, либо по отдельности, либо в комбинации с другими мутациями.

В определенных случаях варианты PCSK9-связывающего полипептида включают варианты гликозилирования, в которых число и/или тип участков гликозилирования были изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями исходного полипептида. В определенных случаях варианты белка содержат большее или меньшее число участков N-связанного гликозилирования, чем нативный белок. Дополнительные предпочтительные варианты антител включают цистеиновые варианты, в которых один или несколько цистеиновых остатков удалены или заменены другой аминокислотой (например, серином) по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. Цистеиновые варианты могут быть применимы, когда антитела должны подвергаться повторному фолдингу в биологически активную конформацию, например, после выделения нерастворимых телец включения. Цистеиновые варианты, как правило, содержат меньше цистеиновых остатков, чем нативный белок и обычно содержат четное число, чтобы свести к минимуму взаимодействия, обусловленные неспаренными цистеиновыми остатками.

Конкурирующие PCSK9-связывающие полипептиды.

Можно применять PCSK9-связывающие полипептиды, которые конкурируют с эволокумабом или функциональными фрагментами, связывающимися с эпитопом, который связывает эволокумаб, за специфическое связывание с PCSK9. Такие PCSK9-связывающие полипептиды также могут связываться с тем же эпитопом, что и PCSK9-связывающие полипептиды, или перекрывающимся эпитопом. PCSK9-связывающие полипептиды и фрагменты, которые конкурируют с эволокумабом или связываются с тем же эпитопом, проявляют аналогичные функциональные свойства. Таким образом, в качестве специфического примера, предусмотренные PCSK9-связывающие полипептиды включают такие, которые конкурируют с антителом или PCSK9-связывающим полипептидом, имеющим все шесть CDR эволокумаба (SEQ ID NO: 4-9) или две легкие цепи и две тяжелые цепи под SEQ ID NO: 2 и 1 соответственно.

Иллюстративные эпитопы.

Предусмотрены эпитопы из SEQ ID NO: 3 (полипептида PCSK9 человека), с которыми связываются антитела к PCSK9. В случае эволокумаба (и варианта эволокумаба, имеющего HCVR под SEQ ID NO: 14 и LCVR под SEQ ID NO: 15), они представляют собой S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238.

Получение PCSK9-связывающих полипептидов (например, антител).

Определенные стратегии можно применять для того, чтобы управлять присущими антителу свойствами, такими как аффинность антитела в отношении его мишени. Такие стратегии включают применение сайт-специфического или случайного мутагенеза полинуклеотидной молекулы, кодирующей антитело, для создания варианта антитела. В определенных случаях за таким созданием следует скрининг в отношении вариантов антитела, которые проявляют требуемое изменение, например, повышенную или сниженную аффинность.

Аминокислотные остатки, на которые нацелены стратегии мутагенеза, могут представлять собой остатки в CDR или FR.

В определенных случаях меньшие и подвергнутые более эффективному скринингу библиотеки вариантов антитела получают путем ограничения случайного или сайт-направленного мутагенеза участками гипермутирования в CDR, которые представляют собой участки, которые соответствуют зонам, расположенным к мутированию во время процесса соматического созревания аффинности.

Антитела могут экспрессироваться в линиях клеток. Последовательности (такие как полинуклеотиды, кодирующие полипептиды под SEQ ID NO: 1 и 2, такие как полинуклеотиды под SEQ ID NO: 12 и 13), кодирующие конкретные антитела, можно применять для трансформации подходящей клетки-хозяина, являющейся клеткой млекопитающего. Трансформацию можно осуществлять с помощью любого известного способа введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Применяемая процедура трансформации зависит от хозяина, подлежащего трансформации. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны их уровня техники и включают декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение с фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

Линии клеток млекопитающих, подходящие для экспрессии в качестве хозяев, хорошо известны из уровня техники и включают множество линий иммортализованных клеток, доступных от Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), клетки эпителия почки человека 293 и ряд других линий клеток.

В определенных случаях антитела продуцирует линия гибридных клеток 21В12 (Jackson et al., 2009). В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды связываются с PCSK9 с константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей менее примерно 1 нМ, например, от 1000 пМ до 100 пМ, от 100 пМ до 10 пМ, от 10 пМ до 1 пМ и/или от 1 пМ до 0,1 пМ или меньше.

PCSK9-связывающие полипептиды могут предусматривать молекулу иммуноглобулина, относящегося к по меньшей мере одному из изоформ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD и IgM. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат легкую каппа-цепь человека и/или тяжелую цепь человека. В определенных случаях тяжелая цепь относится к изоформу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD или IgM. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды были клонированы для экспрессии в клетках млекопитающих. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат константную область, отличную от любой из константных областей изоформа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD и IgM.

В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат легкую лямбда-цепь человека и тяжелую цепь IgG2 человека. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат легкую лямбда-цепь человека и тяжелую цепь IgG4 человека. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат легкую лямбда-цепь человека и тяжелую цепь IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD или IgM человека. В других вариантах осуществления PCSK9-связывающие полипептиды содержат легкую каппа-цепь человека и тяжелую цепь IgG2 человека. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат легкую каппа-цепь человека и тяжелую цепь IgG4 человека. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат легкую каппа-цепь человека и тяжелую цепь IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD или IgM человека. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды содержат переменные области антител, лигированные с константной областью, которая не является ни константной областью из изоформа IgG2, ни константной областью из изоформа IgG4. В определенных случаях PCSK9-связывающие полипептиды были клонированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

В случае эволюкумаба антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело с IgG2-лямбда-цепью; дисульфид тяжелой цепи гамма 2 с тетракисдисульфидом легкой лямбда-цепи. Эволюкумаб является гликозилированным по Asn-291 и Asn-291" и имеет дисульфидные мостики между остатками 22'-90', 22"-90", 22'-96', 22"-96", 129-214', 129"-214", 137'-196', 137"-196", 142-198, 142"-198", 217-217', 218-218', 221-221", 224-224", 255-315, 255"-315", 361-419, и 361"-419".

В определенных случаях консервативные модификации в тяжелой и легкой цепях эволюкумаба или в таких цепях антитела, имеющих HCVR и LCVR под SEQ ID NO: 14 и 15, могут приводить к получению антител к PCSK9, имеющих функциональные и химические характеристики, аналогичные таковым у антител, продуцируемых линией гибридомом 21В12. И наоборот, существенные модификации функциональных или химических характеристик антител к PCSK9 можно осуществлять за счет выбора в аминокислотной последовательности тяжелой и легкой цепей замен, которые значительно отличаются по своему эффекту в отношении поддержания (а) структуры молекулярного остова в зоне замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевом участке или (с) объема боковой цепи.

Например, консервативная аминокислотная замена может предусматривать замену нативного аминокислотного остатка на ненативный остаток, вследствие чего на полярность или заряд аминокислотного остатка в данном положении оказывается незначительное влияние или влияние отсутствует.

PCSK9-связывающие полипептиды часто предусматривают один или несколько полипептидов. Лю-

бую из множества систем "вектор экспрессии/хозяин" можно применять для экспрессии полинуклеотидных молекул, кодирующих полипептиды, предусматривающие один или несколько компонентов PCSK9-связывающего полипептида или PCSK9-связывающий полипептид сам по себе. Такие системы включают микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные с помощью рекомбинантного бактериофага, плазмиды или векторов экспрессии на основе космидной ДНК; дрожжи, трансформированные с помощью векторов экспрессии для дрожжей; системы на основе клеток насекомых, инфицированных с помощью вирусных векторов экспрессии (например, бакуловируса); системы на основе растительных клеток, трансфицированных с помощью вирусных векторов экспрессии (например, вируса мозаики цветной капусты, CaMV, вируса табачной мозаики, TMV) или трансформированные с помощью бактериальных векторов экспрессии (например, плазмиды T1 или pBR322); или системы на основе животных клеток.

Полипептид, предусматривающий один или несколько компонентов PCSK9-связывающего полипептида или PCSK9-связывающий полипептид сам по себе, можно очистить из различных систем экспрессии; такие методики хорошо известны специалистам в данной области техники.

Компоненты фармацевтического состава.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, содержащий PCSK9-связывающий полипептид, содержит более одного отличающегося PCSK9-связывающего полипептида. В определенных вариантах осуществления фармацевтические составы содержат более одного PCSK9-связывающего полипептида, при этом антигенсвязывающие белки к PCSK9 связывают более одного эпитопа. В некоторых вариантах осуществления различные антигенсвязывающие белки не будут конкурировать друг с другом за связывание с PCSK9. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит эволюкумаб.

PCSK9-связывающий полипептид может быть связан со средой-носителем, удлиняющей период полувыведения. Такие среды-носители включают полиэтиленгликоль (PEG), гликоген (например, гликозилирование PCSK9-связывающего полипептида) и декстран.

Приемлемые компоненты состава предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов при применяемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические составы могут содержать средства для модификации, поддержания или сохранения, например, значения pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции.

Например, подходящие материалы состава включают аминокислоты (такие как пролин, аргинин, лизин, метионин, таурин, глицин, глутамин или аспарагин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, натрий-фосфатный, натрий-ацетатный ("NaOAc"), Tris-HCl, буфер Tris, цитратный, фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер (т.е. буфер PBS) или буферы на основе других органических кислот); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатообразующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, сахароза, фруктоза, лактоза, манноза, трегалоза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгирующие средства; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахароспирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, триметамин, лецитин, холестерин, тилоксапаль); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, нормализующие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды-носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адьюванты.

В одном аспекте фармацевтический состав содержит высокие концентрации PCSK9-связывающего полипептида. В определенных вариантах осуществления концентрация PCSK9-связывающего полипептида варьируется в диапазоне от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 260 мг/мл, например, составляет приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизительно 170 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 210 мг/мл, приблизительно 220 мг/мл, приблизительно 230 мг/мл, приблизительно 240 мг/мл, приблизительно 250 мг/мл или приблизительно 260 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация эволюкумаба варьируется в диапазоне от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 210 мг/мл, например, составляет приблизительно 140 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизи-

тельно 170 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 210 мг/мл, приблизительно 220 мг/мл, приблизительно 230 мг/мл, приблизительно 240 мг/мл, приблизительно 250 мг/мл или приблизительно 260 мг/мл.

В другом аспекте фармацевтический состав содержит по меньшей мере одно буферное средство, такое как, например, натрий-ацетатный, фосфатный, фосфатно-солевой ("PBS"), гистидиновый буфер и/или буфер Tris со значением pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5. Буфер служит для поддержания физиологически подходящего значения pH. В дополнение, буфер может улучшать изотоничность и химическую стабильность фармацевтического состава. В определенных вариантах осуществления содержание буферного средства варьируется в диапазоне от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ, например, составляет приблизительно 5 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 90 мМ или приблизительно 100 мМ буферного средства. В определенных вариантах осуществления буферное средство представляет собой NaOAc. В определенных вариантах осуществления буферное средство представляет собой NaOAc и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В других вариантах осуществления буфер представляет собой глутамат натрия. В определенных вариантах осуществления буферное средство представляет собой глутамат натрия и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В еще одних вариантах осуществления буферное средство представляет собой фосфатный буфер. В определенных вариантах осуществления фосфатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В еще одних дополнительных вариантах осуществления буферное средство представляет собой гистидин. В некоторых из таких вариантов осуществления гистидиновый буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. Применимые значения pH для фармацевтического состава включают от приблизительно 4 до приблизительно 7, или от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,5, или приблизительно 5, или приблизительно 5,4.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав является изотоническим, при этом его осмоляльность варьируется в диапазоне от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм/кг, например, составляет приблизительно 250 мОсм/кг, приблизительно 260 мОсм/кг, приблизительно 270 мОсм/кг, приблизительно 280 мОсм/кг, приблизительно 290 мОсм/кг, приблизительно 300 мОсм/кг, приблизительно 310 мОсм/кг, приблизительно 320 мОсм/кг, приблизительно 330 мОсм/кг, приблизительно 340 мОсм/кг, приблизительно 350 мОсм/кг, приблизительно 360 мОсм/кг, приблизительно 370 мОсм/кг, приблизительно 380 мОсм/кг, приблизительно 390 мОсм/кг или приблизительно 400 мОсм/кг. Осмоляльность является показателем отношения растворенных веществ к объему жидкости. Другими словами, она представляет собой число молекул и ионов (или молекул) на килограмм раствора. В определенных вариантах осуществления осмоляльность составляет 300 мОсм/кг.

Осмоляльность можно измерять с помощью осмометра, такого как осмометр для нескольких проб модели 2020 от Advanced Instruments, Норвуд, Массачусетс. Осмометр для нескольких проб модели 2020 от Advanced Instruments измеряет осмоляльность с применением способа понижения точки замерзания. Чем выше содержание осмолитов в растворе, тем сильнее снижается температура его замерзания. Осмоляльность также можно измерять с применением любых других способов и в любых других установках, известных из уровня техники, таких как линейная экстраполяция. В других вариантах осуществления фармацевтический состав является изотоническим для клетки крови человека, такой как эритроцит.

В еще одном аспекте фармацевтический состав содержит по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, такое как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80 или полисорбат 20), блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеры, такие как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложные сорбитаналкиловые эфиры (Span®) полиэтиленгликольоктилфениловые эфиры (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловые эфиры (Brij), полипропиленгликольалкиловые эфиры, глюкозидалкиловые эфиры и D- $\alpha$ -токоферолполиэтиленгликольсукцинат (витамин E TPGS). В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит поверхностно-активное вещество при концентрации, которая варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 10 вес. % на объем (вес/объем) состава, например, поверхностно-активное вещество составляет приблизительно 0,0001%, приблизительно 0,005%, приблизительно 0,006%, приблизительно 0,007%, приблизительно 0,008%, приблизительно 0,009%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,5%, приблизительно 1%, приблизительно 5% или приблизительно 10% (вес/объем) состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит полисорбат 80 при концентрации, которая варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1% вес/объем состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит полисорбат 80 при концентрации на уровне приблизительно 0,01% вес/объем состава. В других вариантах осуществления состав содержит Pluronic® F-68 при концентрации, которая варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1% вес/объем состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит Pluronic® F-68 при концентрации на уровне прибли-

зительно 0,01% вес/объем состава. В еще одних вариантах осуществления состав содержит витамин E TPGS при концентрации, которая варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1% вес/объем состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит витамин E TPGS при концентрации на уровне приблизительно 0,01% вес/объем состава.

Фармацевтический состав может содержать по меньшей мере одно стабилизирующее средство, такое как полигидроксиуглеводород, (включая сорбит, маннит, глицерин и дульцит) и/или дисахарид (включая сахарозу, лактозу, мальтозу и трегалозу), и/или аминокислоту (помимо того, что составы содержат соль аргинина, такую как аргинина моногидрохлорид, и ацетильное производное аргинина, такое как N-ацетиларгинин, и они могут содержать, например, пролин, лизин, метионин и таурин), и/или бензиловый спирт; при этом общее содержание указанного полигидроксиуглеводорода, и/или дисахарида, и/или аминокислоты, и/или бензилового спирта составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% вес/объем состава. Фармацевтический состав может содержать пролин, например, на уровне от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ, таком как от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ, таком как от приблизительно 90 мМ до приблизительно 120 мМ, таком как приблизительно 120 мМ.

В одном аспекте фармацевтический состав характеризуется уровнем вязкости, составляющим менее приблизительно 80 сантипуаз (сП), как измерено при комнатной температуре (т.е. при 25°C). В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется уровнем вязкости, составляющим менее приблизительно 70 сП, приблизительно 60 сП, приблизительно 50 сП, приблизительно 40 сП, приблизительно 30 сП, приблизительно 25 сП, приблизительно 20 сП, приблизительно 18 сП, приблизительно 15 сП, приблизительно 12 сП, приблизительно 10 сП; приблизительно 8 сП, приблизительно 6 сП, приблизительно 4 сП; приблизительно 2 сП или приблизительно 1 сП.

В одном аспекте фармацевтический состав является стабильным, как измерено с помощью по меньшей мере одного анализа стабильности, такого как анализ, в котором исследуют биофизические или биохимические характеристики PCSK9-связывающего полипептида с течением времени. Стабильность фармацевтического состава можно измерять с применением SEC-HPLC. SEC-HPLC разделяет белки на основании отличий в их гидродинамических объемах. Молекулы с большими гидродинамическими объемами белка элюируют раньше, чем молекулы с меньшими объемами. В случае SEC-HPLC у стабильного фармацевтического состава наблюдается не более приблизительно 5% увеличения содержания НМВ-разновидностей по сравнению с контрольным образцом, такого как, например, не более приблизительно 4%, не более приблизительно 3%, не более приблизительно 2%, не более приблизительно 1%, не более приблизительно 0,5% увеличения содержания НМВ-разновидностей по сравнению с контрольным образцом.

В качестве альтернативы или дополнения стабильность можно измерять с применением катионообменной HPLC (CEX-HPLC). CEX-HPLC разделяет белки на основании отличий в их поверхностном заряде. При заданном значении pH заряженные изоформы АВР к PCSK9 разделяют на катионообменной колонке и элюируют с применением градиента концентрации солей. Элюент отслеживают с помощью поглощения ультрафиолетового света (UV). Распределение заряженных изоформ оценивают путем определения площади пика каждой изоформы в виде процента от общей площади пиков. В случае CEX-HPLC у стабильного фармацевтического состава наблюдается не более приблизительно 5% снижения пика главной изоформы по сравнению с контрольным образцом, такого как, например, не более от приблизительно 3% до приблизительно 5% снижения пика главной изоформы по сравнению с контрольным образцом; не более приблизительно 4% снижения, не более приблизительно 3% снижения, не более приблизительно 2% снижения, не более приблизительно 1% снижения, не более приблизительно 0,5% снижения пика главной изоформы по сравнению с контрольным образцом.

Также в качестве альтернативы или дополнения стабильность состава можно измерять с применением обнаружения частиц, невидимых невооруженным глазом, с помощью светоблокировки (НИАС). Электронная система подсчета частиц суспензии (НИАС/Royco 9703 (Hach Company; Лавленд, Колорадо) или эквивалент), содержащая сенсор светоблокировки (НИАС/Royco HRLD-150 или эквивалент) с жидкостным пробоотборником, количественно оценивает число частиц и диапазон их размеров в заданном тестируемом образце. Когда частицы в жидкости проходят между источником света и детектором, они ослабляют или "блокируют" луч света, который падает на детектор. Когда концентрация частиц находится в пределах нормального диапазона обнаружения сенсора, эти частицы обнаруживаются поодиночке. Прохождение каждой частицы через зону обнаружения уменьшает интенсивность света, падающего на фотодетектор, и выходное напряжение фотодетектора на мгновение уменьшается. Изменения напряжения регистрируются в виде электрических импульсов, которые преобразуются прибором в число присутствующих частиц. Способ является неспецифическим и измеряет частицы независимо от их происхождения. Размер отслеживаемых частиц обычно составляет 10 мкм и 25 мкм. В случае НИАС у стабильного фармацевтического состава наблюдается не более 6000 частиц размером 10 мкм на контейнер (или единицу) по сравнению с контрольным образцом, как, например, не более 5000, не более 4000, не более 3000, не более 2000, не более 1000 частиц размером 10 мкм на контейнер (или единицу) по сравнению с контрольным образцом. В других случаях у стабильного фармацевтического состава наблюдается не бо-

лее 600 частиц размером 25 мкм на контейнер (или единицу) по сравнению с контрольным образцом, как, например, не более 500, не более 400, не более 300, не более 200, не более 100, не более 50 частиц размером 25 мкм на контейнер (или единицу) по сравнению с контрольным образцом.

Стабильность фармацевтического состава также можно оценивать с применением визуальной оценки. Визуальная оценка представляет собой качественный способ, применяемый для описания видимых физических характеристик образца. Образец просматривают на черном и/или белом фоне в кабине для просмотра, в зависимости от оцениваемой характеристики (например, цвета, прозрачности, присутствия частиц или посторонних включений). Образцы также просматривают в сравнении с эталонным стандартом мутности и эталонными стандартами цвета. В случае визуальной оценки у стабильного фармацевтического состава не наблюдается значительного изменения цвета, прозрачности, присутствия частиц или посторонних включений по сравнению с контрольным образцом.

Иллюстративные фармацевтические составы.

В табл. 4 показаны иллюстративные фармацевтические составы на основе PCSK9-связывающих полипептидов. Для некоторых составов приводятся диапазоны, а для составов из подпунктов примеров (например, 1.1) приводится специфический состав из примера.

Таблица 4

## Иллюстративные фармацевтические составы на основе PCSK9-связывающих полипептидов

Пример	PCSK9-связывающий полипептид	Буфер	Вспомогательные вещества	Поверхностно-активное вещество	Конечное значение pH	Вязкость при 1000/с (сП)	Осмоляльность
1	195-227 мг/мл	10 мМ NaOAc	140 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,2	~80	~270 мОсм/кг
1,1	227 мг/мл	10 мМ NaOAc	63 мМ Arg-HCl	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,2	77,4	269
2	195-227 мг/мл	10 мМ NaOAc	155 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	~50	~300
2,1	218 мг/мл	10 мМ NaOAc	170 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,6	49,6 сП	302
3	195-227 мг/мл	10 мМ NaOAc	170 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,6	~50 сП	~300 мОсм/кг
3,1	222 мг/мл	10 мМ NaOAc	63 мМ Arg-HCl	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,6	52,3 сП	296 мОсм/кг
4	195-227 мг/мл	10 мМ NaOAc	140 мМ NAR	0,005% - 0,015% полисорбата 80	5,1-5,7		
4,1	210 мг/мл	10 мМ NaOAc	140 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	~40 сП	
5	188-190 мг/мл	10 мМ NaOAc	155 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	290	~23
5,1	190 мг/мл	10 мМ NaOAc	120 мМ пролина	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	290	22,8
6	200-201 мг/мл	10 мМ NaOAc	155 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	295	~35
6,1	200 мг/мл	10 мМ NaOAc	120 мМ пролина	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	295	34,5
7	210-214 мг/мл	10 мМ NaOAc	155 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	298	~50
7,1	210 мг/мл	10 мМ NaOAc	155 мМ NAR	0,01% (вес/объем) полисорбата 80	5,4	298	51,4
			120 мМ пролина	0,01% (вес/объем) полисорбата 80			

\* наблюдали ожидаемую вариабельность в измерениях концентрации, процессе составления и измерениях вязкости.

Пути терапевтического применения.

PCSK9-связывающие полипептиды, такие как эволокумаб, можно применять в целом ряде путей терапевтического применения. Например, PCSK9-связывающие полипептиды применимы для лечения состояний, ассоциированных с PCSK9, таких как нарушения, связанные с повышенным уровнем содержания холестерина (нарушения, связанные с повышенным уровнем содержания холестерина в сыворотке крови), такие как гиперхолестеринемия. PCSK9-связывающие полипептиды можно применять при лечении последствий, симптомов и/или патологии, ассоциированной с активностью PCSK9.

С нарушениями, которые связаны с повышенными уровнями, в основе которых лежат повышенные уровни или на которые могут оказывать влияние повышенные уровни содержания молекул или групп молекул, включая уровни содержания холестерина (включая холестерин в сыворотке крови), LDL, LDLR, PCSK9, VLDL-C, аполипопротеина В ("АpoB"), липопротеина А ("Lp(a)", триглицеридов, HDL-C, отличающегося от HDL-C и общего холестерина, можно бороться с помощью способов, в которых применяют фармацевтические композиции на основе эволокумаба, раскрытые в данном документе, для лечения, и/или предупреждения, и/или снижения риска возникновения таких нарушений у субъекта. Рас-

крытые композиции на основе эволокумаба можно применять для модуляции уровней содержания таких молекул или групп молекул, такой как уменьшение количества таких молекул или групп молекул. Например, раскрытые композиции на основе эволокумаба можно применять в способах для снижения количества таких молекул или групп таких молекул от аномально высокого уровня или от даже нормального уровня, то есть можно уменьшать количество холестерина (включая холестерин в сыворотке крови), LDL, LDLR, PCSK9, VLDL-C, ApoB, Lp(a), триглицеридов, HDL-C, отличающегося от HDL-C и уровни содержания общего холестерина.

"Нарушение, связанное с повышенным уровнем содержания холестерина" (которое включает "нарушения, связанные с повышенным уровнем содержания холестерина в сыворотке крови"), включает любое одно или несколько из следующего: семейной гиперхолестеринемии, несемейной гиперхолестеринемии, гиперлипидемии, заболевания сердца, метаболического синдрома, диабета, ишемической болезни сердца, инсульта, сердечно-сосудистых заболеваний, болезни Альцгеймера и дислипидемий в широком смысле, которые могут проявляться, например, как повышенный уровень содержания общего холестерина в сыворотке крови, повышенный уровень содержания LDL, повышенный уровень содержания триглицеридов, повышенный уровень содержания VLDL и/или низкий уровень содержания HDL. Некоторые неограничивающие примеры первичной и вторичной дислипидемий включают метаболический синдром, сахарный диабет, семейную комбинированную гиперлипидемию, семейную гипертриглицеридемию, виды семейной гиперхолестеринемии, включая гетерозиготную гиперхолестеринемию, гомозиготную гиперхолестеринемию, семейную гиперхолестеринемию с дефектным аполипопротеином В-100; полигенную гиперхолестеринемию; семейную дисбеталипопротеинемию, дефицит печеночной липазы; дислипидемию, вторичную для любого из следующего: неразборчивости в питании, гипотиреоза, приема лекарственных средств, включая эстрогеновую и прогестинную терапию, бета-адреноблокаторы и тиазидные диуретики; нефротического синдрома, хронической почечной недостаточности, синдрома Кушинга, первичного билиарного цирроза, болезней накопления гликогена, гепатомы, холестаза, акромегалии, инсулиномы, изолированного дефицита гормона роста и алкогольной гипертриглицеридемии. Раскрытые композиции на основе эволокумаба также можно применять для лечения, и/или предупреждения, и/или снижения риска возникновения атеросклеротических заболеваний, таких как смерть по причине сердечно-сосудистой патологии, смерть не по причине сердечно-сосудистой патологии или смерть от всех причин, ишемическая болезнь сердца, коронарная недостаточность, заболевание периферических артерий, инсульт (ишемический и геморрагический), стенокардия или нарушение мозгового кровообращения, а также острый коронарный синдром, инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия. Раскрытые композиции на основе эволокумаба также могут быть применимы в снижении риска развития смертельного и несмертельного сердечных приступов, смертельного и несмертельного инсультов, определенных типов операций на сердце, госпитализации по причине сердечной недостаточности, боли в груди у пациентов с заболеванием сердца и/или сердечно-сосудистых осложнений вследствие установленного заболевания сердца, такого как ранее перенесенный сердечный приступ, ранее перенесенная операция на сердце, и/или боли в груди с признаками закупоренных артерий, и/или сосудистого заболевания, связанного с трансплантацией. В некоторых случаях раскрытые композиции на основе эволокумаба можно применять в способах предупреждения или снижения риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных повышенным уровнем содержания CRP или hsCRP. В некоторых вариантах осуществления АВР и способы можно применять для снижения риска возникновения рецидивирующих сердечно-сосудистых осложнений.

Заболевания или нарушения, с которыми, как правило, можно бороться (либо лечить, либо предупреждать) с помощью применения статинов, также могут получать пользу от применения раскрытых композиций на основе эволокумаба. Более того, нарушения или заболевания, которые могут получать пользу от предотвращения синтеза холестерина или повышенной экспрессии LDLR, также можно лечить с применением раскрытых композиций на основе эволокумаба. Кроме того, применение раскрытых композиций на основе эволокумаба может быть особенно применимым в лечении диабета. Не только диабет представляет собой фактор риска развития ишемической болезни сердца, но инсулин также повышает экспрессию PCSK9. То есть люди с диабетом имеют повышенные уровни содержания липидов в плазме крови (которые могут быть связаны с высокими уровнями содержания PCSK9) и могут получать пользу от снижения этих уровней.

Когда PCSK9-связывающий полипептид применяется для терапевтических путей применения, PCSK9-связывающий полипептид может подавлять один или несколько видов биологической активности PCSK9, препятствовать им или модулировать их. Например, PCSK9-связывающий полипептид может специфически связываться с PCSK9 человека и/или в значительной степени подавлять связывание PCSK9 человека с LDLR на по меньшей мере приблизительно 20%-40%, 40-60%, 60-80%, 80-85%, или больше (например, согласно измерению связывания в анализе конкурентного связывания *in vitro*). В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид характеризуется  $K_d$ , составляющей менее (связывание более прочное)  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$  М. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид характеризуется IC50 при блокировании связывания LDLR с PCSK9, составляющей менее 1 мкМ, от 1000 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 нМ, от 1000 пМ до 500 пМ, от 500 пМ до

200 пМ, менее 200 пМ, от 200 пМ до 150 пМ, от 200 пМ до 100 пМ, от 100 пМ до 10 пМ, от 10 пМ до 1 пМ.

Фармацевтические составы можно вводить в виде комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими средствами. Комбинированная терапия может предусматривать PCSK9-связывающий полипептид в комбинации с по меньшей мере одним антихолестериновым средством. Средства включают полученные *in vitro* синтетическим путем химические составы, антитела, антигенсвязывающие области, а также их комбинации и конъюгаты. В определенных вариантах осуществления средство может действовать в качестве агониста, антагониста, аллостерического модулятора или токсина. В определенных вариантах осуществления средство может действовать с подавлением или стимуляцией своей мишени (например, активацией или подавлением рецептора или фермента) и тем самым стимулирует повышение экспрессии LDLR или снижение уровней содержания холестерина в сыворотке крови.

PCSK9-связывающий полипептид можно вводить перед, одновременно и после лечения с помощью средства, понижающего холестерин (в сыворотке крови и/или общий холестерин). Например, PCSK9-связывающий полипептид можно вводить профилактически для предупреждения или сдерживания проявления гиперхолестеринемии, заболевания сердца, диабета и/или любого нарушения, связанного с повышенным уровнем содержания холестерина. Более того, PCSK9-связывающий полипептид можно вводить для лечения существующего состояния, представляющего собой гиперхолестеринемии. В некоторых случаях введение PCSK9-связывающего полипептида может отсрочивать проявление нарушения и/или симптомов, ассоциированных с нарушением. В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид вводится субъекту, у которого отсутствуют какие-либо симптомы любого из нарушений, связанных с повышенным уровнем содержания холестерина, или их подкласса.

PCSK9-связывающий полипептид можно применять с конкретными терапевтическими средствами для лечения различных нарушений, связанных с повышенным уровнем содержания холестерина, таких как гиперхолестеринемия. С учетом состояния и требуемого уровня лечения могут вводиться два, три или более средств. Такие средства можно поставлять вместе путем включения в один состав. В качестве альтернативы такие средства можно составлять отдельно и при необходимости поставлять вместе путем включения в набор для лечения. В другом примере такие средства можно поставлять отдельно.

Дозировка и схемы введения доз.

Количество PCSK9-связывающего полипептида, такого как mAb, такого как эволюкумаб, вводимого пациенту, представляет собой терапевтически эффективное количество. Типичная дозировка PCSK9-связывающего белка может варьироваться в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг вплоть до приблизительно 100 мг/кг или больше. В определенных случаях дозировка может варьироваться от 0,1 мг/кг вплоть до приблизительно 100 мг/кг; или от 1 мг/кг вплоть до приблизительно 100 мг/кг; или от 5 мг/кг вплоть до приблизительно 100 мг/кг; или от 1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг; или от 2 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг; или от 2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг PCSK9-связывающего полипептида.

Количество (или доза) PCSK9-связывающего полипептида может варьировать в диапазоне от по меньшей мере приблизительно 10 мг до приблизительно 1400 мг; или от приблизительно 14 мг до приблизительно 1200 мг; или от приблизительно 14 мг до приблизительно 1000 мг; или от приблизительно 14 мг до приблизительно 800 мг; или от приблизительно 14 мг до приблизительно 700 мг; или от приблизительно 14 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 20 мг вплоть до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 70 мг вплоть до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 80 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 90 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 100 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 105 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 110 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 115 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 120 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 125 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 130 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 135 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 140 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 145 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 150 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 160 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 170 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 180 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 190 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 200 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 210 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 220 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 230 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 240 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 250 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 260 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 270 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 280 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 290 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 300 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 310 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 320 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 330 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 340 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 350 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 360 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 370 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 380 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 390 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 400 мг до приблизительно 480 мг;

или от приблизительно 410 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 420 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 430 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 440 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 450 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 460 мг до приблизительно 480 мг; или от приблизительно 470 мг до приблизительно 480 мг PCSK9-связывающего полипептида.

При определении частоты введения дозы будут учитывать фармакокинетические параметры PCSK9-связывающего полипептида и/или любых дополнительных терапевтических средств в составе. Врач-клиницист может вводить состав до достижения дозировки, при которой обеспечивается требуемый эффект. Состав можно вводить в виде однократной дозы или в виде двух, трех, четырех или более доз (которые могут содержать одинаковое или не одинаковое количество PCSK9-связывающего полипептида) с течением времени, или в виде непрерывной инфузии через имплантируемое устройство или катетер. Состав также может доставляться подкожно или внутривенно с помощью иголки и шприца. Что касается подкожной доставки, устройства для доставки в виде шприца-ручка, а также нателный инъектор и автоинъекторные устройства для доставки можно применять для доставки фармацевтических составов, содержащих PCSK9-связывающие полипептиды.

В определенных случаях дозу, составляющую по меньшей мере приблизительно 10 мг; или вплоть до приблизительно 14 мг; или вплоть до приблизительно 20 мг; или вплоть до приблизительно 35 мг; или вплоть до приблизительно 40 мг, или вплоть до приблизительно 45 мг, или вплоть до приблизительно 50 мг; или вплоть до приблизительно 70 мг PCSK9-связывающего полипептида, вводят один раз в неделю (QW) пациенту, нуждающемуся в этом.

В других случаях дозу, составляющую по меньшей мере приблизительно 70 мг, или вплоть до приблизительно 100 мг; или вплоть до приблизительно 105 мг, или вплоть до приблизительно 110 мг; или вплоть до приблизительно 115 мг, или вплоть до приблизительно 120 мг; или вплоть до приблизительно 140 мг; или вплоть до приблизительно 160 мг; или вплоть до приблизительно 200 мг; или вплоть до приблизительно 250 мг; или вплоть до 280 мг; или вплоть до 300 мг; или вплоть до 350 мг; или вплоть до 400 мг; или вплоть до 420 мг PCSK9-связывающего полипептида, вводят один раз в две недели (или через каждые две недели; "Q2W:") пациенту, нуждающемуся в этом.

В других определенных случаях дозу, составляющую по меньшей мере приблизительно 250 мг; или вплоть до приблизительно 280 мг; или вплоть до приблизительно 300 мг; или вплоть до приблизительно 350 мг; или вплоть до приблизительно 400 мг; или вплоть до приблизительно 420 мг; или вплоть до приблизительно 450 мг; или вплоть до 480 мг PCSK9-связывающего полипептида, вводят один раз через каждые четыре недели ("Q4W") (или один раз в календарный месяц) пациенту, нуждающемуся в этом.

Например, эволокумаб можно вводить Q2W в виде доз по 210 мг. В качестве альтернативы эволокумаб можно вводить Q4W в виде доз по 420 мг. В зависимости от особенностей состояния, подлежащего лечению, обе данные дозы лекарственного средства можно вводить раз в неделю.

В некоторых случаях уровень содержания холестерина LDL в сыворотке крови снижается на по меньшей мере приблизительно 15% по сравнению с уровнем содержания холестерина LDL в сыворотке крови до введения дозы. В некоторых вариантах осуществления уровень содержания холестерина LDL в сыворотке крови снижается на по меньшей мере приблизительно 20%, или на по меньшей мере приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% или даже больше.

Хранение и наборы.

Составы, содержащие PCSK9-связывающий полипептид, с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством или без него можно подготовить для хранения путем смешивания выбранного состава, характеризующегося требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для получения состава в форме лиофилизированной массы или водного раствора. Кроме того, состав, содержащий PCSK9-связывающий полипептид, с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством или без него можно составлять в виде лиофилизата с применением соответствующих вспомогательных веществ.

После того, как фармацевтический состав был составлен, его можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или в виде обезвоженного или лиофилизованного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизованной), которую восстанавливают перед введением. В некоторых случаях составы на основе PCSK9-связывающего полипептида можно хранить в контейнерах, таких как подходящие пакеты для хранения (например, производимые Sartorius (Готтинген, Германия)) или в поликарбонатных бутылках. После того, как фармацевтический состав бы составлен, его также можно хранить в предварительно заполненных шприцах (PFS; таких как PFS объемом 2,25 мл) в виде раствора или суспензии в готовой к применению форме, а также в стеклянных флаконах (таких как стеклянные флаконы объемом 5 см<sup>3</sup>).

В определенных вариантах осуществления предусмотрены наборы для получения единицы введения в виде однократной дозы. В определенных вариантах осуществления набор может содержать как первый контейнер, содержащий высушенный белок, так и второй контейнер, содержащий водный состав. В определенных вариантах осуществления предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные

предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

Ультрафильтрация/диафильтрация составов на основе PCSK9-связывающий полипептида, содержащих N-ацетиларгинин.

С помощью раскрытых способов UF/DF можно получать составы, содержащие приблизительно 210 г/л PCSK9-связывающих полипептидов. Например, в раскрытых способах раствор после первой диафильтрации (DF1) с концентрацией, составляющей 70 г/л (или 35 г/л), подвергают диафильтрации три раза и концентрируют до 140 г/л. Затем раствор после второй диафильтрации (DF2) с концентрацией, составляющей 140 г/л, подвергают диафильтрации четыре раза и концентрируют до концентрации, составляющей 260 г/л. Затем концентрированный пул извлекают из системы с помощью раствора для промывки состава с получением конечной концентрации, составляющей 210 г/л.

В раскрытых способах концентрация при первой ультрафильтрации (UF1), составляющая приблизительно 70 мг/мл и приблизительно 35 мг/мл, как показано в примерах, не оказывает значительного влияния на содержание HWM (%) в конечном лекарственном веществе (DS). Более того, в раскрытых способах на стадии DF необходимо всего лишь семь диаобъемов DF, чтобы гарантировать завершение диафильтрации.

Раскрытый способ UF/DF обобщен в табл. 5 и 6.

Таблица 5  
Общая процедура UF/DF и рабочие параметры

Описание процесса	Условия
Общая информация	Мембрана/Температура/Размерные характеристики мембраны
Уравновешивающий (EQ) буфер/буфер для DF	Буферы для составов с NAR
Концентрирование 1 (UF1)	Концентрировать до целевой концентрации для DF Трансмембранное давление (TMP) составляет 18 psi Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH (литры/м <sup>2</sup> /ч)
Диафильтрация 1 (DF1)	3 диаобъема TMP составляет 18 psi Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH
Концентрирование 2 (UF2)	Концентрировать до целевой концентрации для DF TMP составляет 18 psi Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH
Диафильтрация 2 (DF2)	4 диаобъема

	ТМР составляет 18 psi
	Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH
Концентрирование 3 (сверхконцентрирование; ОС)	Концентрировать до целевой концентрации ТМР изначально составляет 18 psi; регулирующий клапан полностью открыт
	Скорость поперечного потока подачи составляет 60 LMH
	Рабочая температура 37°C
Рециркуляция	10-минутная рециркуляция
	Скорость поперечного потока подачи составляет 60 LMH
	Путь для фильтрата закрыт (отсутствие ТМР)
Извлечение	Извлечь раствор белка через нижнюю точку или канал для концентрата Прогнать с помощью буфера через канал для концентрата
Очистка	≥20 л/м <sup>2</sup> один прогон 30-минутная рециркуляция, 20 л/м <sup>2</sup>
Хранение	≥20 л/м <sup>2</sup> один прогон

**Таблица 6**  
**Рабочие параметры способа UF/DF**

Стадия	Параметр	Единица измерения	Целевое значение	Рабочий диапазон
Прокачка	Раствор для прокачки		PW/вода для инъекций (WFI) или DIW	н. д.
	Поток подачи	LMH	300	н. д.
	Объем подачи	л/м <sup>2</sup>	20	н. д.
	Объем фильтрата	л/м <sup>2</sup>	>10	н. д.
	Стратегия рабочего контроля		Открыт клапан фильтрата одного прогона	н. д.

	Раствор для тестирования в отношении целостности		PW/WFI или DIWW	н. д.
Тестирование в отношении целостности	Диффузионный поток	мл/мин	0,11 м <sup>2</sup> =14 0,57 м <sup>2</sup> =60 1,14 м <sup>2</sup> =117	н. д.
	Давление при тестировании	psig	30	н. д.
	Время тестирования	мин.	10	н. д.
	Раствор для NWP		PW/WFI или DIW	н. д.
NWP	LMH/psig	NWP	8-14, >70% новой мембраны для NWP	н. д.
Уравновешивание мембраны	Поток подачи Раствор для EQ	LMH	300	н. д.
	Объем подачи	л/м <sup>2</sup>	20	н. д.
	Объем фильтрата	л/м <sup>2</sup>	>10	н. д.
	TMP	psig	20	н. д.
			Открыт клапан	н. д.
	Стратегия рабочего контроля		фильтрата одного прогона	
	Целевое значение концентрации	г/л	70	н. д.
Концентрирование 1	Поток подачи	LMH	≤300	н. д.
	TMP	psig	18	н. д.
	Рабочая температура	°C	20	±5,0
	Буфер для диафильтрации		Раствор NAR	н. д.
Диафильтрация 1	Число диаобъемов	число	3	н. д.
	Поток подачи	LMH	≤300	н. д.
	TMP	psig	18	± 5,0
	Рабочая температура	°C	20	± 5,0
Концентрирование 2	Целевое значение концентрации	г/л	140	н. д.
	Поток подачи	LMH	≤300	н. д.
	TMP	psig	18	± 5,0

## 045816

	Рабочая температура	°C	20	± 5,0	
	Буфер для диафильтрации		Раствор NAR	н. д.	
Диафильтрация 2	Число диаобъемов	число	4	н. д.	
	Поток подачи	LMH	≤300	н. д.	
	TMP	psig	18	н. д.	
	Рабочая температура	°C	20	н. д.	
Концентрирование 3	Целевое значение концентрации	г/л	260	н. д.	
	Поток подачи	LMH	≤60	н. д.	
			Изначально составляет 18.	н. д.	
	TMP	psig	По мере полного открытия клапана для TMP контроль TMP больше не осуществляется		
	Рабочая температура	°C	37	± 2,0	
Извлечение продукта	Рециркуляция при низком давлении	Режим потока	описание	Закрыт клапан общего рециркулирующего фильтрата	
		Скорость потока	LMH	60	
		Время рециркуляции	минуты	10	
		Целевое значение концентрации	г/л	240	
		Буфер для извлечения		Раствор NAR	
		Объем прокачки через концентрат	Скользкий перепускной объем	1	
		Температура резервуара для		20	
	Извлеченные продукты	концентрата после извлечения	°C		± 2,0

Очистка мембраны	Начальная прокачка	Режим потока		Открыт клапан фильтра одного прогона	н. д.	
		Раствор для очистки		0,5 М NaOH	н. д.	
	Объем подачи	л/м <sup>2</sup>	20		н. д.	
	Объем фильтра	л/м <sup>2</sup>	>10		н. д.	
	Поток подачи	LMH	300		н. д.	
	TMP	psig	20		н. д.	
	Рециркуляция	Режим потока		Открыт клапан общего рециркулирующего фильтра	н. д.	
		Раствор для очистки		0,5 М NaOH	н. д.	
		Время рециркуляции	минуты	30		н. л.
		Объем рециркуляции	л/м <sup>2</sup>	20		н. д.
		Поток подачи	LMH	300		н. д.
		TMP	psig	20		н. д.
Хранение	Режим потока		Открыт клапан фильтра одного прогона			
		Раствор для хранения		0,1 М NaOH		
	Объем подачи	л/м <sup>2</sup>	20			
	Объем фильтра	л/м <sup>2</sup>	>10			
	Поток подачи	LMH	300			
	TMP	psig	20			

Таким образом, в данном документе раскрыт способ составления PCSK9-связывающего полипептида, такого как PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR, предусматривающий:

- первую стадию концентрирования, на которой полипептид в первом растворе концентрируют;
- первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй раствор, содержащий N-ацетиларгинин, с применением диафильтрации;
- вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют;
- вторую стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин, с применением диафильтрации; и
- третью стадию концентрирования, на которой полипептид в третьем растворе концентрируют;

Перед третьей стадией концентрирования температуру раствора, содержащего полипептид, могут повышать от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C, например, до приблизительно 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, и приблизительно 37°C. Также первую стадию замены раствора можно проводить с применением по меньшей мере трех диаобъемов второго раствора; в некоторых случаях можно применять дополнительные диаобъемы, например, четыре, пять или шесть диаобъемов. Вторую стадию замены раствора можно проводить с применением по меньшей мере четырех диаобъемов третьего раствора; однако можно применять дополнительные диаобъемы, включая пять, шесть или семь диаобъемов. Начальная концентрация PCSK9-связывающего полипептида может составлять приблизительно 11 мг/мл или меньше, например, менее 1 мг, или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или приблизительно 11 мг/мл. Кроме того, концентрацию PCSK9-связывающего полипептида можно повышать в от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, например, в приблизительно 3, 4, 5, 6 или приблизительно 7 раз. Например, повышенная концентрация полипептида составляет от приблизительно 35 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл или больше, например, приблизительно 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, или приблизительно 70 мг/мл или больше. На второй стадии концентрирования концентрация PCSK9-связывающего полипептида повышается в от приблизительно 2 до 4 раз относительно первой стадии концентрирования (например, в приблизительно 2, 3 или приблизительно 4 раза), например, до приблизительно 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 250, или приблизительно 300 мг/мл. На третьей стадии концентрирования концентрацию PCSK9-связывающего полипептида можно повышать в от приблизительно 1,5 до приблизительно 2

раз относительно второй стадии концентрирования, например, до приблизительно 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 200, 250 или приблизительно 300 мг/мл, например, до приблизительно 260 мг/мл. Следовательно, PCSK9-связывающий полипептид может характеризоваться конечной концентрацией, которая по меньшей мере в приблизительно 19-20 раз превышает начальную концентрацию терапевтического полипептида, например, составляет приблизительно 210 мг/мл. Стадии концентрирования могут предусматривать ультрафильтрацию с периодической загрузкой; к тому же, второй раствор и третий раствор могут быть идентичными.

Второй или третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин (например, "раствор NAR"), может содержать соль аргинина и буфер, где, например, N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ, как, например, приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, или приблизительно 230 мМ; соль аргинина представляет собой Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат и присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, например, приблизительно 25, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, или приблизительно 150 мМ; и буфер представляет собой натрий-ацетатный буфер при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или приблизительно 30 мМ. В других подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 до приблизительно 170 мМ; Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 63 до приблизительно 70 мМ (например, приблизительно 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 или приблизительно 70 мМ), и натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. Например, N-ацетиларгинин может присутствовать при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В дополнительных подаспектах N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 70 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ. В еще одном примере N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 170 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Более того, композиции (включая растворы NAR) могут дополнительно содержать пролин, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ, например, приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, или приблизительно 150 мМ. Второй или третий раствор может характеризоваться значением pH, составляющим от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9, например, приблизительно 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, или приблизительно 6,9, например 5,3, 5,4 или 5,5. На первой и второй стадиях замены раствора можно применять мембрану для диалфильтрации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

a) размера отверстий сетки, который превышает приблизительно 350 мкм, но меньше или равен приблизительно 500 мкм, например, приблизительно 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, или приблизительно 500 мкм;

b) площади живого сечения, которая превышает приблизительно 32%, но меньше или равна приблизительно 36% (например, приблизительно 32, 33, 34, 35 или приблизительно 36%) от площади мембраны;

c) плотности сетки, составляющей менее приблизительно 16,2 нити/см, но больше или равной приблизительно 12,2 нити/см, например, приблизительно 16,2, 16, 15,8, 15,6, 15,4, 15,2, 15, 14,8, 14,6, 14,4, 14,2, 14, 13,8, 13,6, 13,4, 13,2, 13, 12,8, 12,6, 12,4 или приблизительно 12,2 нити/см;

d) диаметра нити, который превышает приблизительно 270 мкм, но меньше или равен приблизительно 340 мкм, например, приблизительно 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330 или 340 мкм;

e) базового веса, который превышает приблизительно 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равен 180 г/м<sup>2</sup>, например, приблизительно 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, или 180 г/м<sup>2</sup>;

f) толщины, которая превышает приблизительно 515 мкм, но меньше или равна приблизительно 610 мкм;

g) загрузки мембраны, превышающей приблизительно 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной приблизительно 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и

h) максимального давления подачи, составляющего приблизительно 60 psi.

Более того, к третьему раствору после концентрирования можно добавлять поверхностно-активное вещество, такое как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80 или полисорбат 20), блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеры, такие как Pluronic® F-68 и другие ви-

ды Pluronic®), сложные сорбитаналкиловые эфиры (Span®) полиэтиленгликольоктилфениловые эфиры (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловые эфиры (Brij), полипропиленгликольалкиловые эфиры, глюкозидалкиловые эфиры и D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцинат (витамин E TPGS). В некоторых случаях поверхностно-активное вещество представляет собой блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена (Pluronic® F-68) или D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцинат (витамин E TPGS). Концентрация поверхностно-активного вещества может варьироваться в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 10 вес. % на объем ("вес/объем") состава, например, поверхностно-активное вещество составляет приблизительно 0,0001%, приблизительно 0,005%, приблизительно 0,006%, приблизительно 0,007%, приблизительно 0,008%, приблизительно 0,009%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,5%, приблизительно 1%, приблизительно 5% или приблизительно 10% (вес/объем) состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит полисорбат 80 при концентрации, которая варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1% вес/объем состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит полисорбат 80 при концентрации на уровне приблизительно 0,01% вес/объем состава. В других вариантах осуществления состав содержит Pluronic® F-68 при концентрации, которая варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1% вес/объем состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит Pluronic® F-68 при концентрации на уровне приблизительно 0,01% вес/объем состава. В еще одних вариантах осуществления состав содержит витамин E TPGS при концентрации, которая варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1% вес/объем состава. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит витамин E TPGS при концентрации на уровне приблизительно 0,01% вес/объем состава.

Следующий раздел "Примеры" приводится исключительно в качестве примера, а не изложен для какого-либо ограничения настоящего изобретения или формулы изобретения.

### Примеры

Измерения вязкости выполняли с применением реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр), если не отмечено иное.

Пример 1. План экспериментального исследования (DOE); оптимизация составов на основе эволюкумаба, содержащих N-ацетиларгинин.

План экспериментального исследования (DOE) предложен для оптимизации составов на основе эволюкумаба, содержащих N-ацетиларгинин. Одиннадцать составов тестировали в отношении вязкости, силы нажатия на предварительно заполненный шприц, стабильности, значения pH и осмоляльности. Данные о начальных параметрах составов показаны в табл. 7.

Таблица 7

План эксперимента для составов на основе эволюкумаба с NAR, данные для нулевого момента времени

№	Целевое значение pH	Целевое значение [эволюкумаб] (мг/мл)	Целевое значение [NAR]	Поверхностно-активное вещество	Целевое значение [ацетат]	Значение pH	Осмоляльность	[эволюкумаб] (мг/мл)	Вязкость при 1000/с (сП)	Сила нажатия при	Сила нажатия при	Сила нажатия при
										10 с (Н)	12 с (Н)	20 с (Н)
1	5	190	140	0,05% F68	30	4,94	257	192	29,5	34	28	17
2	5	210	140	0,05% TPGS	30	4,94	261	204	42,7	47	38	23
3	5,4	190	140	0,01% PS80	10	5,35	243	192	26,8	29	24	15
4	5,4	210	140	0,05% F68	10	5,36	254	207	49,0	51	41	25
5	5,2	200	155	0,01% PS80	20	5,11	265	198	33,5	37	30	19
6	5,2	200	155	0,05% F68	20	5,10	261	197	34,6	38	31	19
7	5,2	200	155	0,05% TPGS	20	5,10	266	201	32,3	38	31	19
8	5	210	170	0,01% PS80	30	4,99	299	213	45,2	47	38	23
9	5	210	170	0,05% F68	30	5,01	290	213	46,7	48	39	24
10	5	210	170	0,05% TPGS	30	4,98	292	214	49,4	49	40	25
11	5,4	190	170	0,05% TPGS	10	5,34	286	189	24,3	29	24	15

Концентрацию ацетата сводили к минимуму для уменьшения скорости агрегации на основании данных, полученных после инкубации в течение одного месяца при 40°C, показанных на фиг. 1. Концентрацию пролина повышали до 120 мМ, чтобы сделать состав изотоническим. N-ацетиларгинин (155 мМ) выбирали для сохранения баланса между уменьшением вязкости и кристаллизацией N-ацетиларгинина,

наблюдаемой при концентрации 170 мМ при 4°C. Данные также указывали, что варьирование поверхностно-активного вещества между полисорбатом-80 (TWEEN® 80; полиоксиэтиленсорбитанмоноолеатом), Pluronic® F-68 (блок-сополимером полиоксиэтилена и полиоксипропилена) и витамином Е TPGS (D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцинатом) не приводило к значительному отличию в вязкости или стабильности.

На основании этих данных было обнаружено, что состав, содержащий 10 мМ ацетата, 155 мМ N-ацетиларгинина, 120 мМ пролина, 0,01% полисорбата-80, со значением pH 5,4, является подходящим для снижения вязкости состава на основе эволокумаба при высоких концентрациях (например, 190-210 мг/мл). Данные, представленные в таблице 8, указывают на то, что данный состав является изотоническим и характеризуется низкой вязкостью.

Таблица 8

Данные в нулевой момент времени для составов на основе эволокумаба с концентрацией 190-210 мг/мл, содержащих 10 мМ ацетата, 155 мМ N-ацетиларгинина, 120 мМ пролина, 0,01% полисорбата-80, со значением pH 5,4

Состав	[эволокумаб]	Значение pH	Осмоляльность	Вязкость
10/155/120-0,01%	188	5,38	290	22.
PS-80-190 мг/мл				
10/155/120-0,01%	201	5,40	295	34,5
PS-80-200 мг/мл				
10/155/120-0,01%	214	5,43	298	51,4
PS-80-210 мг/мл				

Пример 2. Исследование DOE для оценки воздействия концентрации вспомогательного вещества, значения pH и буфера.

Примеры 2-4 направлены на составы, которые оптимизировали для максимального уменьшения вязкости, при этом сводя к минимуму любое воздействие на агрегацию, дезамидирование и другие факторы, служащие признаком стабильности.

N-ацетиларгинин (NAR) выбирали на основании его превосходного влияния на уменьшение вязкости в исследованиях по скринингу вспомогательных веществ (см., например, пример 1). Концентрация NAR ограничивалась его растворимостью при 2-8°C. Концентрацию NAR, составляющую 155 мМ в буфере для диалфильтрации (DF), выбирали на основании исследований стабильности, показавших отсутствие кристаллизации NAR при концентрациях вплоть до 175 мМ. Аргинин-HCl (70 мМ) добавляли в буфер для DF для обеспечения изотонического состава лекарственного препарата с самой низкой вязкостью и для улучшения растворимости NAR. Состав со значением pH 5,4 выбирали, чтобы свести к минимуму агрегацию и дезамидирование эволокумаба. Буфер и поверхностно-активное вещество (ацетат/полисорбат-80) оказывали минимальное влияние на вязкость и стабильность состава на основе эволокумаба.

Для исследования стабильности эволокумаба в составах, содержащих NAR/аргинин-HCl, осуществляли три основных исследования. Они были следующими.

1. Исследование DOE для оценки воздействия концентрации вспомогательного вещества, значения pH и буфера (ацетата в сравнении с глутаматом) (пример 2).

2. Исследование широкого диапазона значений pH, которое разработали для оценки воздействия значения pH (5,1-6,9) на вязкость/стабильность (пример 3).

3. Исследование в уменьшенном масштабе для оценки стабильности ведущих составов-кандидатов, включая влияние типовых процессов производства лекарственного препарата (пример 4).

Результаты.

В качестве целевого значения устанавливали целевое значение вязкости ≤ 50 сП. Скрининг вязкости составов показал, что NAR был наиболее эффективным вспомогательным веществом для уменьшения вязкости. Однако вследствие ограниченной растворимости NAR комбинацию NAR и аргинина-HCl применяли для обеспечения изотонического состава и достижения задачи получения состава на основе эволокумаба с концентрацией 210 мг/мл с вязкостью, меньшей или равной 50 сП. Краткое описание выбранных составов, которые оценивали во время скрининга, показано на фиг. 2.

Исследование DOE разрабатывали для оценки воздействия концентрации NAR/аргинина-HCl, значения pH и разновидностей буфера на стабильность и вязкость эволокумаба при 210 мг/мл. Для каждого образца изменяемые параметры составов показаны в таблице 9. План исследования предусматривал концентрации NAR в диапазоне 155-175 мМ, концентрации аргинина-HCl в диапазоне 50-100 мМ и значения pH, составляющие от 4,8 до 5,4. Исследование также предусматривало сравнение ацетатного и глутаматного буферов при 10 мМ. Исследование предусматривало контрольный состав с концентрацией 140 мг/мл, содержащий пролин, который получали из той же партии исходного материала, что и образцы, содержащие NAR/Arg-HCl, и заполняли его в PFS. Образцы подвергали стерилизующей фильтрации с применением фильтров из PVDF с размером пор 0,2 мкм и заполняли вручную в стеклянные PFS при

объеме заполнения, составляющем ~2,0 мл.

Таблица 9  
План исследования POE

Значение pH	NAR (мМ)	Arg-HCl (мМ)	Буфер	PS-80	Эволокумаб (мг/мл)	Код образца
4,8	155	50	10 мМ ацетата	0,01%	210	DOE 1-10/155/50, значение pH 4,8
5,4	155	50	10 мМ глутамата	0,01%	210	DOE 2-10/155/50, значение pH 5,4
4,8	175	50	10 мМ глутамата	0,01%	210	DOE 3-10/175/50, значение pH 4,8
5,4	175	50	10 мМ ацетата	0,01%	210	DOE 4-10/175/50, значение pH 5,4
5,1	165	75	10 мМ ацетата	0,01%	210	DOE 5-10/165/75, значение pH 5,1
5,1	165	75	10 мМ глутамата	0,01%	210	DOE 6-10/165/75, значение pH 5,1
4,8	155	100	10 мМ глутамата	0,01%	210	DOE 7-10/155/100, значение pH 4,8
5,4	155	100	10 мМ ацетата	0,01%	210	DOE 8-10/155/100, значение pH 5,4
4,8	175	100	10 мМ ацетата	0,01%	210	DOE 9-10/175/100, значение pH 4,8
5,4	175	100	10 мМ глутамата	0,01%	210	DOE 10-10/175/100, значение pH 5,4
5,0	0	0	20 мМ ацетата	0,01%	140	Контроль с концентрацией 140 мг/мл, содержащий пролин

Данные по значениям pH, концентрации, осмоляльности и вязкости представлены в табличной форме в табл. 10. Наблюдаемые значения pH были близки к целевым значениям для всех образцов. Осмоляльность в исследовании перекрывала диапазон 256-392 мОсм/кг. Оказалось, что вязкость демонстрирует непостоянную тенденцию в направлении снижения вязкости при повышении значения pH.

Таблица 10  
Данные о значениях pH, концентрации, осмоляльности и вязкости на основании DOE

Образец	Значение pH	Концентрация	мОсм/ кг	Вязкость (сП при 1000 с <sup>-1</sup> , 25 °С)
1-10/155/50, значение pH 4,8	4,83	209,0	256	45,3
2-10/155/50, значение pH 5,4	5,29	209,0	271	43,8
3-10/175/50, значение pH 4,8	4,81	210,6	301	46,6
4-10/175/50, значение pH 5,4	5,31	212,9	297	41,0
5-10/165/75, значение pH 5,1	5,07	211,9	326	48,2
6-10/165/75, значение pH 5,1	5,03	209,8	340	47,5
7-10/155/100, значение pH 4,8	4,80	208,5	369	44,9
8-10/155/100, значение pH 5,4	5,29	210,3	366	38,8
9-10/175/100, значение pH 4,8	4,84	208,7	376	43,9
10-10/175/100, значение pH 5,4	5,33	209,2	392	36,6

Анализ данных эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления (SE-HPLC) с применением программного обеспечения для статистического анализа JMP (SAS; Кэри, Северная Каролина; фиг. 3А и 3В) выявил значительные влияния значения pH и концентрации аргинина-HCl на потерю вели-

чины главного пика в процентах при 40°C в течение 1 месяца (фиг. 3А). Более низкое значение pH и более высокая концентрация аргинина-HCl вызывали большую потерю главного пика, в первую очередь, из-за повышения пика агрегатов и, в меньшей степени, пика олигомеров. Оба пика вместе относились к категории высокомолекулярных (HMW) разновидностей. На фиг. 4 показаны влияния значения pH и аргинина-HCl на процентное содержание HMW-разновидностей для момента времени 1 месяц при 40°C. В образцах со значением pH 4,8 наблюдали значимо более высокие уровни процентного содержания HMW-разновидностей по сравнению с образцами со значением pH 5,4. К тому же, влияние более высокой концентрации аргинина-HCl, приводящей к более высокому процентному содержанию HMW-разновидностей, было значительно более выражено при значении pH 4,8 по сравнению со значением pH 5,4.

На фиг. 5А-5С показаны хроматограммы SE-HPLC для выбранных образцов со значением pH 4,8 и значением pH 5,4 по сравнению контролем с концентрацией 140 мг/мл, содержащего пролин, выдерживаемых при 5°C в течение 6 месяцев, 25°C в течение трех месяцев и 40°C в течение 1 соответственно. На хроматограммах показана тенденция к повышению уровней содержания агрегатов при значении pH 4,8 относительно значения pH 5,4. На хроматограммах также показано, что профиль разрушения был сравнимым у образцов с концентрацией 210 мг/мл, содержащих NAR/Arg-HCl, в сравнении с контролем с концентрацией 140 мг/мл, содержащим пролин, несмотря на более высокую скорость агрегации, наблюдаемой у образцов с концентрацией 210 мг/мл, содержащих NAR/Arg-HCl.

Несмотря на отличия, связанные со значением pH и концентрацией Arg-HCl, наблюдаемые при 40°C, для всех составов, исследуемых в данном эксперименте, показано сравнимое процентное содержание HMW-разновидностей при выдерживании в течение вплоть до 6 месяцев при 5°C и вплоть до 1 месяца при 25°C (фиг. 6А, 6В).

Триптическое пептидное картирование с помощью анализа на основе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) осуществляли на выбранных образцах. Хроматограммы пептидных карт, полученные с помощью HPLC-ультрафиолетового (UV) детектора, визуально сравнивали с контрольными составами на основе эволюкумаба, содержащими пролин, и эталонным стандартом эволюкумаба. Никаких новых пиков у образцов, содержащих NAR/Arg-HCl, по сравнению с контролем не обнаруживали (фиг. 8). К тому же, анализ химических модификаций, проводимый с помощью масс-спектрометрии, не показал значимых изменений между образцами, содержащими NAR/Arg-HCl, и контролями. Осуществляли относительное количественное определение, и в табл. 11 показаны процентные доли дезамидирования по N55 и N33, а также окисления по M246 и M422. Немного более высокие уровни дезамидирования по N55 наблюдали у образцов, содержащих NAR/Arg-HCl, со значением pH 5,4, в сравнении с образцами, содержащими NAR/Arg-HCl, со значением pH 5,1, и образцами, содержащими пролин, со значением pH 5,0, что согласуется с повышением кислотного пика, наблюдаемого с помощью СЕХ. Оказалось, что N33 (потенциальный участок дезамидирования в определяющей комплементарности области (CDR)) не демонстрировал значимого повышения дезамидирования при оцененных диапазоне значений pH и условиях. Скорости окисления по обоим M246 и M422 были выше у контрольных образцов с концентрацией 140 мг/мл, содержащих пролин, в сравнении с образцами с концентрацией 210 мг/мл, содержащими NAR/Arg-HCl, после инкубации при ASC.

Таблица 11  
Дезамидирование и окисление эволюкумаба (выбранные образцы)

Образец	% дезамидирования		% окисления	
	по N55	по N33	по M246	по M422
10/165/75, ацетат, значение pH 5,1, 5°C, 3 месяца	11,6	0,8	5,4	3,7
10/165/75, ацетат, значение pH 5,1, 25°C, 3 месяца	11,8	0,7	6,0	3,8
10/165/75, ацетат, значение pH 5,1, 40°C, 1 месяц	13,6	0,9	8,4	5,1
10/155/100, ацетат, значение pH 5,4, 5°C, 3 месяца	12,3	0,9	5,4	3,7
10/155/100, ацетат, значение pH 5,4, 25°C, 3 месяца	12,1	0,6	6,1	3,9
10/155/100, ацетат, значение pH 5,4, 40°C, 1 месяц	15,2	0,8	8,4	5,2
Контроль с концентрацией 140 мг/мл, содержащий пролин, значение pH 5,0, 5°C, 3 месяца	10,6	0,6	5,6	3,7
Контроль с концентрацией 140 мг/мл, содержащий пролин, значение pH 5,0, 25°C, 3 месяца	10,8	0,7	6,7	3,8
Контроль с концентрацией 140 мг/мл, содержащий пролин, значение pH 5,0, 40°C, 1 месяц	11,8	0,7	11,0	6,5

Число частиц, невидимых невооруженным глазом, которое определено путем подсчета частиц суспензии с помощью светоблокировки и визуализации микропотока (MFI), не показало значимых тенденций, коррелирующих с исследуемыми изменяемыми параметрами составов (фиг. 9А-9С и фиг. 10). Количество частиц, невидимых невооруженным глазом, были сравнимыми у образцов с концентрацией 210 мг/мл, содержащих NAR/Arg-HCl, и контроля с концентрацией 140 мг/мл, содержащего пролин.

На фиг. 11 собраны данные по вязкости по результатам данного исследования в нулевой момент времени, моменты времени три месяца и шесть месяцев. Данные указывают на то, что вязкость оставалась постоянной в течение вплоть до шести месяцев при 5°C и 25°C для всех составов. При 40°C образцы демонстрировали рН-зависимое повышение вязкости, что коррелировало с повышением процентного содержания НМВ-разновидностей, наблюдаемым по результатам SE-HPLC при 40°C (фиг. 4).

Наблюдения.

Почти изотонический состав (~300 мОсм/кг) обеспечивался у состава со средними параметрами в данном исследовании (10 мМ буфера, 165 мМ NAR, 75 мМ аргинина-HCl).

Повышение значения рН приводит к снижению процентного содержания агрегатов после ускоренного старения, как наблюдается с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), а также к повышению дезамидирования с более высокой процентной величиной для разновидностей в кислой среде, как обнаружено с помощью катионообменной хроматографии.

Концентрация аргинина-HCl оказывала большее воздействие на стабильность (приводила к повышенной агрегации при 25°C и 40°C) при значении рН 4,8 и ее влияние сводилось к минимуму при значении рН 5,4.

Ацетат и глутамат являются сравнимыми по их влиянию на стабильность и вязкость.

Никаких новых пиков не наблюдали у образцов, содержащих NAR/Arg-HCl, в сравнении с контролями, содержащими пролин, при пептидном картировании выбранных образцов для моментов времени вплоть до трех месяцев при 5°C и 25°C и одного месяца при 40°C.

Вязкость остается стабильной вплоть до шести месяцев при 5°C и 25°C.

NAR остается растворимым в составах при 5°C при концентрациях в буфере для DF вплоть до 175 мМ с концентрациям Arg-HCl в диапазоне 50-100 мМ.

Пример 3. Исследование в отношении значений рН.

Исследование в отношении значений рН разрабатывали для дополнительного изучения влияния значения рН в пределах более широкого диапазона. Исследование включало составы с целевым диапазоном значений рН, составляющим 5,1-6,9. Значение рН и буфер, используемые для каждого образца, приведены в табл. 12. Все образцы составляли при концентрации 210 мг/мл с 10 мМ буфера, 165 мМ NAR, 75 мМ аргинина-HCl, 0,01% полисорбата-80. Образцы подвергали стерилизующей фильтрации с применением фильтров из PVDF с размером пор 0,2 мкм и заполняли вручную в стеклянные PFS при объеме заполнения, составляющем 2,0 мл.

Таблица 12

Изменяемые параметры, представляющие собой значение рН и буфер, для составов на основе эволюкума (210 мг/мл), содержащих 165 мМ NAR, 75 мМ Arg-HCl и 0,01% (вес/объем) полисорбата-80

Образец	Значение рН	Буфер
1	5,1	Ацетатный
2	5,4	Ацетатный
3	5,7	Ацетатный
4	6,0	Гистидиновый
5	6,3	Гистидиновый
6	6,6	Фосфатный
7	6,9	Фосфатный

Результаты.

Значения рН для каждого образца в нулевой момент времени и через три месяца при 40°C показаны на фиг. 12.

На фиг. 13А-13С показано влияние значения рН на процентное содержание НМВ-разновидностей (процентное содержание олигомеров+процентное содержание агрегатов) по результатам SE-HPLC в течение вплоть до трех месяцев при 4°C, 25°C и 40°C соответственно. Данные, полученные при 5°C и 25°C, демонстрировали минимальное отличие у составов с отличающимся значением рН. Наиболее значимым отличием, коррелирующим со значением рН, были более высокие уровни процентного содержания НМВ-разновидностей в нулевой момент времени для составов со значениями рН 6,6 и рН 6,9. На фиг. 14 показан график уровней содержания олигомеров в нулевой момент времени в зависимости от значения рН. Небольшую тенденцию к повышению уровня содержания олигомеров наблюдали при повышении значения рН, при этом резкое повышение наблюдали в случае значения рН, превышающего 6,3. Уровни содержания олигомеров падали до минимума при более низком значении рН.

Как наблюдали ранее в исследовании DOE (пример 2), процентное содержание НМВ-

разновидностей повышалось с течением времени при 40°C для каждого исследуемого значения pH, при этом более низкое значение pH коррелировало с более высокими начальными скоростями повышения.

По результатам сравнения хроматограмм SE-HPLC для момента времени три месяца при 40°C повышенные уровни пика агрегатов увеличивались с понижением значения pH (фиг. 15).

На фиг. 16A-16C показано влияние значения pH на величину главного пика в процентах по результатам СЕХ-НРЛС в течение вплоть до шести месяцев при 5°C (фиг. 16A), 25°C (фиг. 16B) и 40°C (фиг. 16C). В момент времени шесть месяцев при 5°C отсутствовало значимое изменение величины главного пика в процентах у образцов со значением  $pH \leq 6,0$ , в то же время наблюдали снижение величины главного пика в процентах для образцов со значением  $pH \geq 6,3$  (фиг. 16A). Данные СЕХ-НРЛС при АСС на фиг. 16B и фиг. 16C указывали на то, что величина главного пика в процентах снижался с увеличением значения pH, и что скорость снижения значительно увеличивалась при значении  $pH > 6,0$ .

На фиг. 17 показано, что pH-зависимое снижение величины главного пика в процентах СЕХ при 40°C было обусловлено повышением процентной величины для разновидностей в кислой среде.

Сравнение хроматограмм СЕХ-НРЛС для момента времени три месяца при 25°C можно видеть на фиг. 18. Величина кислотного пика в процентах возрастала с увеличением значения pH, и значительное изменение хроматографического профиля наблюдали у образцов со значением pH, превышающим 6,3.

Триптическое пептидное картирование с помощью анализа на основе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) осуществляли на образцах после хранения в течение 1 месяца при 40°C. Хроматограммы пептидных карт, полученные с помощью HPLC-UV детектора (фиг. 19), визуально сравнивали с эталонным стандартом и в пределах диапазона значений pH. К тому же, анализ химических модификаций с помощью масс-спектрометрии продемонстрировал отсутствие значительных изменений, коррелирующих со значением pH, за исключением дезамидирования по N55 и N33. Относительные количественные уровни дезамидирования по N55 и N33, а также окисления по M246 и M422 показаны в табл. 13. Повышение уровней процента дезамидирования по N55 и процента дезамидирования по N33 коррелировало с повышенными уровнями величины кислотного пика в процентах, наблюдаемыми у данных СЕХ-НРЛС с повышением значения pH. Оказалось, что отсутствует значительное влияние значения pH на уровни окисления по M246 или M422.

Таблица 13  
Дезамидирование и окисление эволокумаба

Образец	pH	%			
		дезамидирован ия по N55	дезамидирован ия по N33	окисления по M246	окисления по M422
Значение	pH				
5,1-5°C,	4	10,7	0,7	5,8	1,5
месяца					
Значение	pH				
5,1-40°C,	1	13,7	1,1	7,1	1,9
месяц					
Значение	pH				
5,4-40°C,	1	15,5	0,9	6,5	1,5
месяц					
Значение	pH				
5,7-40°C,	1	19,6	1,3	6,9	1,6
месяц					
Значение	pH				
6,0-40°C,	1	24,8	2,0	6,3	1,5
месяц					
Значение	pH				
6,3-40°C,	1	31,9	2,4	5,8	1,1
месяц					
Значение	pH				
6,6-40°C,	1	53,3	4,9	6,7	1,3
месяц					
Значение	pH				
6,9-40°C,	1	70,5	10,0	6,9	1,4
месяц					

Результаты биологических анализов образцов, выдерживаемых в течение одного месяца при 40°C, наносили на график на фиг. 20 вместе с начальной величиной главного пика в процентах (СЕХ-НРЛС) и процентом N55 и процентом N33 (без дезамидирования).

Число частиц, невидимых невооруженным глазом, которое определено путем подсчета частиц суспензии с помощью светоблокировки (фиг. 21А-21С) и MFI (фиг. 22), демонстрировало отсутствие значимых тенденций, которые коррелировали со значением pH.

Данные на фиг. 23 показывают, что значение pH оказывало минимальное влияние на фрагментацию или другое разрушение, как измерено в анализе с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS), в течение вплоть до шести месяцев при 25°C. Процентное содержание предшественников легких цепей плюс легкие цепи+тяжелые цепи (предшественников LC+LC+HC) на фиг. 23 показывает небольшое снижение на границах диапазона значений pH. Образцы с более низким значением pH содержали немного более высокое процентное содержание среднемолекулярных (MMW) разновидностей, в то же время образцы с более высоким значением pH содержали немного более высокое процентное содержание НМW-разновидностей. Процентное содержание низкомолекулярных (LMW) разновидностей является сравнимым в пределах диапазона значений pH.

Наконец, как показано на фиг. 24, имеется хорошо выраженная линейная взаимосвязь между вязкостью и значением pH, при этом наблюдается снижение на 6,6 сП на единицу pH.

Наблюдения.

Повышение значения pH привело к (1) снижению скорости агрегации при 40°C, (2) более высоким начальным уровням содержания олигомера, (3) повышенной скорости дезамидирования при 25°C и 40°C и (4) более низкой вязкости. Оказалось, что значение pH не оказывает значительного влияния на видимые или невидимые невооруженным глазом частицы, также оказалось, что значение pH не оказывает значительного влияния на фрагментацию или другое разрушение, как измерено с помощью rCE-SDS.

Пример 4. Исследование в уменьшенном масштабе.

Три состава подвергали оценке возможности коммерческого производства и стабильности. Составы-кандидаты подвергали различным типовым процессам, имитирующим коммерческое производство, перед помещением на испытание стабильности.

Результаты.

Физические свойства определяли для каждого составленного лекарственного вещества.

Определили, что у каждого состава значение pH было на ~ 0,17 выше, чем значение pH буфера для DF. В случае состава 3 буфер для DF характеризовался значением, которое на 0,14 превышало целевое значение, что привело к значению pH у DS, которое на 0,31 превышало целевое значение.

Результаты SE-HPLC по стабильности лекарственного препарата (процентное содержание НМW-разновидностей) при 5°C, 25°C и 40°C, показаны на фиг. 25А-25С. Скорости повышения процентного содержания НМW-разновидностей были сравнимыми для всех трех образцов при 5°C и 25°C, при этом скорость агрегации была немного выше у образца 1 (характеризующегося более низким значением pH) при 40°C.

Данные CEХ-HPLC показаны на фигурах 26А-26С и демонстрируют ожидаемые зависимые от значения pH и температуры повышения величины кислотного пика в процентах, которые наблюдали в предыдущих исследованиях (см. предыдущие примеры).

Данные rCE-SDS, показанные на фиг. 27, демонстрируют сравнимые уровни процентного содержания предшественников LC+HC+LC для каждого из составов в уменьшенном масштабе при всех протестированных температурах и моментах времени.

Уровни мутности незначительно менялись в течение вплоть до четырех месяцев при 5°C и 25°C, но повышались после 4 месяцев при 40°C.

Концентрации образцов в уменьшенном масштабе регулировали до 200, 210 и 220 мг/мл для каждого состава. Образцы тестировали с помощью реометра m-VROC™ (RheoSense; Сан-Рамон, Калифорния) при скоростях сдвига вплоть до 90000 с<sup>-1</sup> и при температурах от 18°C до 28°C. Данные на фиг. 28 охватывали диапазон вязкости 22-52 сП и иллюстрировали воздействия концентрации белка, температуры и изменения состава на вязкость.

Наблюдения.

Уровни процентного содержания НМW-разновидностей и скорости агрегации по результатам SE-HPLC согласовывались с наблюдаемыми в предыдущих исследованиях (например, см. предыдущие примеры).

Уровни и скорости изменений величин главного, кислотного и основного пиков в процентах, определенные с помощью CEХ-HPLC, согласовывались с наблюдаемыми в предыдущих исследованиях.

Данные rCE-SDS продемонстрировали отсутствие значительной фрагментации или другого разрушения вплоть до трех месяцев при RSC и ASC.

Пример 5. Ультрафильтрация/диафильтрация эволокумаба в составах, содержащих N-ацетиларгинин.

Материалы и способы.

В экспериментах по разработке ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) в малом масштабе применяли каскету Pellicon® 3 с мембраной Ultracel PLCTK с отсечением по молекулярной массе 30 кДа (D Screen, 0,11 м<sup>2</sup>; EMD Millipore; Биллерика, Массачусетс). Эксперименты осуществляли на технологиче-

ской системе для фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) (PendoTECH; Принстон, Нью-Джерси). Эксперименты осуществляли при комнатной температуре ( $22,2 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Эксперименты по разработке UF/DF осуществляли в малом масштабе для оценки трех буферов для составов с NAR с разными значениями pH и сравнивали их данные потока фильтрата в зависимости от концентрации. Применяли две стадии DF, чтобы сэкономить за счет снижения потребления NAR. Дополнительные эксперименты осуществляли для стадии UF1/DF1, чтобы оценить влияние двух целевых концентраций (35 мг/мл и 70 мг/мл) на образование высокомолекулярных разновидностей в ходе процесса UF/DF. Другие рабочие параметры UF/DF не оценивали. Общая процедура экспериментов UF/DF описана в табл. 14.

Таблица 14  
Общая процедура UF/DF и рабочие параметры

Описание процесса	Условия	Оценивали
Общая информация	Мембрана/Температура/Размерные характеристики мембраны	Нет
Уравновешивающий (EQ) буфер/буфер для DF	Буферы для составов с NAR	Да
	Концентрировать до целевой концентрации для DF	Да
Концентрирование (UF1)	1 Трансмембранное давление (TMP) составляет 18 psi Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH (литры/м <sup>2</sup> /ч) 3 диаобъема	Нет  Да
Диафильтрация 1 (DF1)	TMP составляет 18 psi Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH	Нет
Концентрирование 2 (UF2)	Концентрировать до целевой концентрации для DF TMP составляет 18 psi Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH	Да Нет
Диафильтрация 2 (DF2)	4 диаобъема TMP составляет 18 psi Скорость поперечного потока подачи составляет 300 LMH	Да Нет
Концентрирование 3 (сверхконцентрирование; OC)	Концентрировать до целевой концентрации TMP изначально составляет 18 psi; регулировочный клапан полностью открыт Скорость поперечного потока подачи составляет 60 LMH Рабочая температура 37°C	Да Нет
Рециркуляция	10-минутная рециркуляция Скорость поперечного потока подачи составляет 60 LMH Путь для фильтрата закрыт (отсутствие TMP)	Нет
Извлечение	Извлечь раствор белка через	Нет

	нижнюю точку или канал для концентрата	
	Прогнать с помощью буфера через канал для концентрата	
	≥20 л/м <sup>2</sup> один прогон	Нет
Очистка	30-минутная рециркуляция, 20 л/м <sup>2</sup>	
Хранение	≥20 л/м <sup>2</sup> один прогон	Нет

Измерения  $A_{280}$  осуществляли с применением спектрофотометра с переменной длиной оптического пути (система SoloVPE; SoloVPE; Бриджуотер, Нью-Джерси) с коэффициентом экстинкции  $1,5 \text{ (см)}^{-1} \text{ (г/л)}^{-1}$ .

Аналитические методы, используемые для оценки качества пула продукта, включали SE-HPLC, rCE-SDS и CEX-HPLC.

NAR: Ac-Arg-OH, номер по каталогу Biochem E-1025.

Результаты исследования буфера для составов с NAR.

В данном эксперименте оценивали три буфера для составов с NAR в способе UF/DF. При выполнении способа UF/DF следовали общим рекомендациям (1) эволюкумаб концентрировали до 70 мг/мл посредством концентрирования с периодической загрузкой (UF1) и выполняли диафильтрацию с буфером для состава с NAR с помощью 3 диаобъемов (DF1); (2) белок дополнительно концентрировали до 140 мг/мл (UF2) и выполняли диафильтрацию с буфером для состава с NAR с помощью 4 диаобъемов (DF2); (3) белок сверхконцентрировали до целевого значения ~260 мг/мл и извлекали из системы при 37°C. Загрузка белка/площадь мембраны составляла 1468 г/м<sup>2</sup> в случае NAR при значении pH 5,4 и 800 г/м<sup>2</sup> в случае NAR при значениях pH 5,2 и 5,6.

Данные о потоке наносили на график в зависимости от концентрации и выполняли сравнение для всех буферов для составов с NAR. К тому же, уровни содержания вспомогательных веществ анализировали путем отбора проб на каждой стадии диафильтрации, чтобы исследовать эффективность диафильтрации и определить минимальные диаобъемы.

Результаты и наблюдения.

Данные о потоке из исследования UF/DF применяли для создания графика зависимости потока фильтрата от концентрации, показанного на фиг. 29. Профили потока были сравнимыми у трех буферов для состава с NAR. Поток возрастал при проведении замены буфера у белка на буфер для состава с NAR (DF1 и DF2), но значительно снижался с увеличением концентрации белка (UF1, UF2 и OC). Общее технологическое время UF/DF составляло приблизительно 20 часов в случае NAR со значением pH 5,4 и 10 часов в случае NAR со значениями pH 5,2 и 5,6 вследствие разных площадей мембран. Результаты с аналогичным профилем потока продемонстрировали, что буфер для состава с NAR не оказывал значительного влияния на поток в способе. Краткое описание исследований UF/DF лекарственного вещества (DS) эволюкумаба в малом масштабе показано в табл. 15.

Образцы отбирали на стадиях диафильтрации (DF1 и DF2) при каждом диаобъеме (от 1 до 7 DV), чтобы протестировать эффективность диафильтрации и определить минимальное число диаобъемов. Результаты анализов репрезентативных образцов в табл. 16 получены из исследования UF/DF эволюкумаба с NAR со значением pH 5,4. Результаты показали, что после пяти диаобъемов диафильтрация с заменой на NAR со значением pH 5,4 была практически завершена.

Таблица 15

Краткое описание исследований UF/DF DS эволюкумаба в малом масштабе

Изменяемый параметр	Значение pH		
	5,2	5,4	5,6
Исходные материалы	эволюкумаб HMP VFP, 11 мг/мл		
Буфер для состава	10 мМ ацетата, 140 мМ NAR, 63 мМ Arg-HCl	10 мМ ацетата, 70 мМ NAR, мМ Arg-HCl	10 мМ ацетата, 170 мМ NAR, мМ Arg-HCl
Загрузка мембраны	800	1467,5	800
(г/м <sup>2</sup> )			
OC (г/л)	262	270	268
Концентрация DS (г/л)	226	217	222
Вязкость DS в cП при 1000 с <sup>-1</sup>	77,4	49,6	52,3

Таблица 16

Уровни содержания вспомогательных веществ на каждой стадии DF при UF/DF эволюкумаба с NAR со значением pH 5,4

Образец	Ацетат (мМ)	Аргинин (мМ)	NAR (мМ)	Na (мМ)	Cl (мМ)	Tris (мМ)
DF0	91,243	н. д.	н. д.	155,97	99,9	1,29
DF1-1 DV	38,271	34,193	115,805	25,94	69,8	0,21
DF1-2 DV	20,435	52,299	153,178	26,78	60,4	0,22
DF1-3 DV	13,903	44,951	163,453	9,88	56,8	0,08
DF2-4 DV	11,354	46,28	167,072	6,08	56,4	0,05
DF2-5 DV	10,287	45,819	157,11	4,69	55,5	0,04
DF2-6 DV	10,354	46,283	166,749	3,80	61,7	0,03
DF2-7 DV	10,134	46,488	162,536	4,86	58,1	0,04

Пример 6. Отслеживание концентрации DS и образования HMW-разновидностей во время UF/DF составов на основе эволюкумаба.

Целью данного эксперимента была оценка целевой концентрации при концентрировании с периодической загрузкой/диафильтрации (UF1/DF1) и определение целевой концентрации для сведения к минимуму образования HMW-разновидностей во время процесса UF/DF. При выполнении процесса UF/DF следовали общим рекомендациям, перечисленным в табл. 17. Эволюкумаб (11 мг/мл) концентрировали до 35 мг/мл или 70 мг/мл посредством концентрирования с периодической загрузкой (UF1). Загрузка белка/площадь мембраны составляла 800 г/м<sup>2</sup>, и буфер для состава с NAR содержал 10 мМ ацетата, 155 мМ N-ацетиларгинина, 70 мМ аргинина-HCl, со значением pH 5,3.

К тому же, на каждой стадии UF/DF отбирали образцы белка для определения качества пула продукта, чтобы оценить процесс UF/DF. Данные о качестве пула продукта применяли для исследования влияния разных концентраций продукта UF1/DF1 на образование HMW-разновидностей.

Материалы и способы.

Обратитесь к примеру 5.

Результаты и наблюдения.

На фиг. 30 показан график, сравнивающий образование HMW-разновидностей (%) в процессе UF/DF эволюкумаба при концентрации 35 мг/мл и 70 мг/мл на стадии UF1/DF1 (UF/DF-70 и UF/DF-35). Изначально содержание HMW-разновидностей (%) в UF/DF-70-UF1 было на 0,2% выше, чем в UF/DF-35-UF1, но содержание HMW-разновидностей (%) было сравнимым после UF1 и таким же в конечной DS. Результат указывает на то, что HWM-разновидности были обратимыми и целевая концентрация на стадии UF1 не оказывала значительного влияния на образование HWM-разновидностей в конечной DS. Рекомендуется, чтобы целевая концентрация составляла 70 мг/мл для снижения объема пула.

Пример 7. Исследования с выдерживанием пула для трех DS с NAR, полученных с помощью UF/DF в малом масштабе.

В данном примере отслеживали стабильность трех партий эволюкумаба, составленных с тремя буферами для состава с NAR. По десять мл образца каждой DS выдерживали при 2-8°C. В каждый момент времени, показанный на фигурах 31-A-31F, отбирали образец объемом приблизительно 1 мл и переносили на выдерживание при 2-8°C для проведения аналитического тестирования.

Результаты и наблюдения.

Результаты SE-HPLC и CEX для эволюкумаба в составах эволюкумаба с NAR, выдерживаемых при 2-8°C, показаны на фигурах 36 и 37. Результаты CEX и rCE-SDS дали сравнимые результаты. Партии DS, полученные с помощью NAR со значениями pH 5,2, 5,4 и pH 5,6, содержали 1,4%, 1,5% и 1,7% HMW-разновидностей соответственно во время процесса UF/DF в сравнении с 1,1% в исходном материале. % HMW-разновидностей наносили на график для сравнения исходного материала эволюкумаба и DS с NAR на протяжении 11 недель, что изображено на фиг. 32. Все три партии состава характеризовались увеличением содержания (%) HMW-разновидностей на 0,4% - 0,5%. Данные партии DS были стабильными в течение по меньшей мере 7 дней при 2-8°C.

Пример 8. Исследования выдерживания пула в процессе получения сверхконцентрированного (260 г/л) эволюкумаба НМР СРD1 с NAR при 37°C, 39°C, 42°C и 45°C.

Оценивали стабильность сверхконцентрированного (260 г/л) эволюкумаба в процессе получения при 37°C, 39°C, 42°C и 45°C. По тридцать мл ОС-образцов инкубировали на водяной бане в помещении с установленными контролируруемыми температурами. В каждый момент времени, показанный на фиг. 33 и 34, отбирали образец объемом приблизительно 1 мл, замораживали и переносили на сухой лед для анализа. Значения вязкости измеряли в ОС-образцах при более высоких температурах и сравнивали со значениями во время выдерживания при 23°C и 25°C.

Результаты и наблюдения.

Результаты SE-HPLC показали, что ОС эволюкумаб с NAR был стабильным в течение трех часов при 37°C, 39°C и 42°C, но не при 45°C, как показано на фиг. 33. Результаты CEX и rCE-SDS были срав-

нимыми. На фиг. 34 показано, что при повышении температуры вязкость ОС снижалась, и при повышении температуры от 37°C до 42°C вязкость падала на 19% (на 14,7 сП).

Названия разделов, используемые в данном документе, предназначены лишь для организационных целей, и их не следует толковать как ограничение описываемого объекта изобретения. Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включая патенты, заявки на патент, статьи, книги и трактаты, настоящим в явной форме включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей.

Пример 9. Исследование устойчивости DOE состава.

План экспериментального исследования (DOE) устойчивости состава разрабатывали для изучения влияния изменяемых параметров состава в пределах определенного проектного поля на стабильность эволюкумаба. Исследуемые изменяемые параметры включали концентрацию эволюкумаба, концентрацию NAR, концентрацию Arg-HCl и значение pH. Восемнадцать составов, перечисленных в табл. 17, подвергли стерилизующей фильтрации с применением фильтров из PVDF с размером пор 0,2 мкм и заполняли вручную в стеклянные предварительно заполняемые шприцы при объеме заполнения, составляющем 2,0 мл. Образцы тестировали с помощью набора аналитических способов, измеряющих стабильность, после инкубации при различных температурах. Все составы содержали 10 мМ ацетата натрия и 0,01% (вес/объем) полисорбата-80 в дополнение к компонентам, перечисленным в табл. 17.

Таблица 17  
План исследования

Образец	Код образца	[эволюкумаб] I (мг/мл)	Вспомогательные вещества*	Значение pH
1	210A54NARRT80	210	140 мМ NAR, 50 мМ Arg-HCl	5,4
2	210A54NARRT80	210	140 мМ NAR, 50 мМ Arg-HCl	5,4
3	197A51NAR <sub>154</sub> R <sub>55</sub> T80	197	154 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,1
4	197A51NAR <sub>126</sub> R <sub>45</sub> T80	197	126 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,1
5	223A51NAR <sub>154</sub> R <sub>45</sub> T80	223	154 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,1
6	223A51NAR <sub>126</sub> R <sub>45</sub> T80	223	126 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,1
7	197A57NAR <sub>126</sub> R <sub>55</sub> T80	197	126 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,7
8	197A51NAR <sub>126</sub> R <sub>55</sub> T80	197	126 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,1
9	197A51NAR <sub>154</sub> R <sub>45</sub> T80	197	154 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,1
10	223A51NAR <sub>126</sub> R <sub>55</sub> T80	223	126 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,1
11	223A57NAR <sub>126</sub> R <sub>45</sub> T80	223	126 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,7
12	223A57NAR <sub>154</sub> R <sub>55</sub> T80	223	154 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,7
13	223A57NAR <sub>154</sub> R <sub>45</sub> T80	223	154 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,7
14	197A57NAR <sub>126</sub> R <sub>45</sub> T80	197	126 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,7
15	197A57NAR <sub>154</sub> R <sub>55</sub> T80	197	154 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,7
16	223A57NAR <sub>126</sub> R <sub>55</sub> T80	223	126 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,7
17	197A57NAR <sub>154</sub> R <sub>45</sub> T80	197	154 мМ NAR, 45 мМ Arg-HCl	5,7
18	223A51NAR <sub>154</sub> R <sub>55</sub> T80	223	154 мМ NAR, 55 мМ Arg-HCl	5,1

\* составы содержали 10 мМ ацетата натрия и 0,01% (вес/объем) полисорбата-80, как отмечено в тексте.

В табл. 18 показаны измеренные концентрации эволокумаба, значения рН и концентрации вспомогательных веществ для каждого из исследуемых составов. Все являются близкими к целевым уровням, перечисленным в табл. 17.

Таблица 18

Начальные данные для состава лекарственного препарата				
№	[эволокумаб]	Значение	[NAR]	[Аргинин]
образца	(мг/мл)	рН	(мМ)	(мМ)
1	209	5,51	145,0	56,7
2	211	5,46	143,5	56,2
3	191	5,14	156,7	60,9
4	201	5,17	126,3	46,9
5	226	5,13	160,2	48,2
6	225	5,13	127,8	47,9
7	198	5,67	135,8	63,1
8	199	5,14	125,1	59,1
9	202	5,13	161,8	49,9
10	224	5,12	136,1	64,5
11	220	5,71	132,1	51,5
12	223	5,73	161,7	63,3
13	218	5,75	159,7	50,7
14	197	5,76	128,5	50,5
15	194	5,79	157,6	61,7
16	227	5,72	141,0	67,3
17	196	5,72	154,2	58,1
18	226	5,17	153,6	57,8

#### Результаты и наблюдения.

Для оценки агрегации выполняли анализ SE-HPLC в отношении составов, показанных в табл. 18, после 0-6 месяцев инкубации при 4°C (фиг. 35A), 25°C (фиг. 35B) и 40°C (фиг. 35C и 35D). Данные указывали на то, что скорости повышения % НМВ-разновидностей были подобными для всех составов в условиях 4°C и 25°C, но рН-зависимое влияние на агрегацию наблюдали в условиях ускоренного старения при 40°C. Наблюдали, что образцы с более низким значением рН, которые характеризовались значением рН 5,1, проявляли самую высокую скорость агрегации при 40°C, при этом наблюдали, что образцы со значением рН 5,7 проявляли самую медленную скорость агрегации (фиг. 35C и 35D). Наблюдали, что образцы со значением рН 5,4 при 40°C проявляли скорости агрегации, промежуточные между образцами со значениями рН 5,1 и 5,7, но данные скорости больше напоминали более низкие скорости агрегации, наблюдаемые у образцов со значением рН 5,7 (фиг. 35C и 35D).

Влияние значения рН на повышение % кислотного пика с течением времени (вплоть до трех месяцев) проверяли с применением анализа СЕХ-HPLC, данные которого показаны на фиг. 36A (кислотный пик) и 36B (основной пик) для 4°C; на фиг. 36C (кислотный пик) и 36D (основной пик) для 25°C; и на фиг. 36E (кислотный пик) и 36F (основной пик) для 40°C. Как показали данные для образцов при 25°C и 40°C (фиг. 36C-36F), наблюдали, что значение рН влияет на % кислотного и основного пиков в данных составах. Данные для образцов со значением рН 5,7 были четко связаны с более высокими скоростями повышения % кислотного пика, в то же время данные для образцов со значением рН 5,1 демонстрировали самую низкую скорость повышения. Наблюдали, что два образца со значением рН 5,4 характеризуются скоростями разрушения, расположенными непосредственно между наблюдаемыми скоростями разрушения у образцов со значениями рН 5,1 и рН 5,7. Оказалось, что тенденции изменения % основного пика являются менее выраженными, но наблюдали тенденцию в направлении более высоких уровней % главного пика при более низких значениях рН у образцов, инкубируемых при 40°C.

Фрагментацию или другое разрушение эволокумаба в составах в течение вплоть до трех месяцев как при 30°C, так и при 40°C анализировали с применением анализов rCE-SDS и SE-HPLC; на фигурах 37A-37B представлены данные для образцов, инкубируемых при 30°C, а на фигурах 37C-37D показаны данные для образцов, инкубируемых при 40°C. Никакой значимой тенденции для данных rCE-SDS, связанных с композицией состава, в пределах проектного поля данного исследования не наблюдали.

Для составов определяли присутствие и количества частиц, невидимых невооруженным глазом, с течением времени вплоть до трех месяцев, как определено путем подсчета частиц с помощью светоблокровки с применением НІАС после инкубации при 4°C и 40°C; эти данные показаны на фиг. 38A-38D. (На фиг. 38A (частицы больше или равны 10 мкм) и 38B (частицы больше или равны 25 мкм) показаны результаты для образцов, выдерживаемых при 4°C; на фигурах 38C (частицы больше или равны 10 мкм)

и 38D (частицы больше или равны 25 мкм) показаны результаты для образцов, выдерживаемых при 40°C). На основании этих данных не наблюдали значимой тенденции в количествах частиц, невидимых невооруженным глазом, связанных с исследуемыми изменяемыми параметрами составов.

Данные, полученные в данном примере, показывают, что в пределах исследуемого узкого проектного поля не наблюдали значимого воздействия на стабильность во время хранения при 4°C или 25°C. Данные, связанные со значением pH при 40°C, позволили предположить, что значение pH влияло на скорость агрегации, как обнаружено с помощью SE-HPLC, а также на процентную величину для разновидностей в кислой среде и, в меньшей степени, на процентную величину для разновидностей в щелочной среде, как обнаружено с помощью CEX-HPLC.

#### **Иллюстративные варианты осуществления**

В данном документе раскрыты иллюстративные варианты осуществления фармацевтических композиций, содержащих эволюкумаб, при этом такие композиции содержат N-ацетиларгинин, и фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 80 сП (измеренной, например, с помощью реометра, такого как реометр AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)). Более того, в данном документе раскрыты способы составления терапевтических полипептидов, таких как эволюкумаб, где такие композиции содержат NAR.

Вариант осуществления 1. Фармацевтическая композиция, содержащая:

а) PCSK9-связывающий полипептид, который выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариabельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариabельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR; и

b) N-ацетиларгинин,

где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 80 сП.

Вариант осуществления 2. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 1, где PCSK9-связывающий полипептид представляет собой моноклональное антитело, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR):

а) CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и

б) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

Вариант осуществления 3. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 2 или 3, где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 50 сП.

Вариант осуществления 4. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 2 или 3, где фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм/кг.

Вариант осуществления 5. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 4, где фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей приблизительно 300 мОсм/кг.

Вариант осуществления 6. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 5, где фар-

мацевтическая композиция является изотонической для клетки крови человека.

Вариант осуществления 7. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 1, где PCSK9-связывающий полипептид присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 260 мг/мл.

Вариант осуществления 8. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 2, где концентрация PCSK9-связывающего полипептида составляет приблизительно 210 мг/мл.

Вариант осуществления 9. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-8, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ.

Вариант осуществления 10. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 9, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 мМ до приблизительно 170 мМ.

Вариант осуществления 11. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 10, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ.

Вариант осуществления 12. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-11, дополнительно содержащая буфер.

Вариант осуществления 13. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 13, где буфер выбран из группы, состоящей из ацетатного, глутаматного, гистидинового и фосфатного буферов или их комбинации.

Вариант осуществления 14. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 13, где буфер присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ.

Вариант осуществления 15. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 14, где буфер представляет собой ацетат натрия и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 16. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-15, где значение pH составляет от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9.

Вариант осуществления 17. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 11, где значение pH составляет приблизительно 5,4.

Вариант осуществления 18. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-17, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество.

Вариант осуществления 19. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 18, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликольоктилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS).

Вариант осуществления 20. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 19, где поверхностно-активное вещество присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1% (вес/объем).

Вариант осуществления 21. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 20, где поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

Вариант осуществления 22. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-21, дополнительно содержащая пролин.

Вариант осуществления 23. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 22, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 24. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 23, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 90 мМ до приблизительно 120 мМ.

Вариант осуществления 25. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 22 или 23, где пролин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 120 мМ.

Вариант осуществления 26. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-25, дополнительно содержащая соль аргинина.

Вариант осуществления 27. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 26, где соль аргинина присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 28. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27, где соль аргинина присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ.

Вариант осуществления 29. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 26, где соль аргинина представляет собой аргинин-HCl, аргинина ацетат или аргинина глутамат.

Вариант осуществления 30. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 29, где аргинин-HCl присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ.

Вариант осуществления 31. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-30, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 2 лет, если хранится при приблизительно -30°C или ниже.

Вариант осуществления 32. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 31, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 5 лет.

Вариант осуществления 33. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-30, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, если хранится при приблизительно 5°C.

Вариант осуществления 34. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 33, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 24 месяцев.

Вариант осуществления 35. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-30, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно 25°C.

Вариант осуществления 36. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 35, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно трех месяцев.

Вариант осуществления 37. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 35, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев.

Вариант осуществления 38. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-30, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно 40°C.

Вариант осуществления 39. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-38, где композиция содержит высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида на уровне менее приблизительно 3% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 40. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 39, где высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида присутствуют на уровне менее приблизительно 2,5% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 41. Фармацевтическая композиция, содержащая:

а) PCSK9-связывающий полипептид, который выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи,

которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR; и

b) N-ацетиларгинин;

c) соль аргинина;

d) буфер и

e) поверхностно-активное вещество,

где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 80 сП (измеренной, например, с помощью реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)).

Вариант осуществления 42. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41, где PCSK9-связывающий полипептид представляет собой моноклональное антитело, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR):

а) CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и

б) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

Вариант осуществления 43. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41 или 42, где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 50 сП.

Вариант осуществления 44. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41 или 42, где фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм/кг.

Вариант осуществления 45. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 44, где фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей приблизительно 300 мОсм/кг.

Вариант осуществления 46. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 45, где фармацевтическая композиция является изотонической для клетки крови человека.

Вариант осуществления 47. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41 или 42, где PCSK9-связывающий полипептид присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 260 мг/мл.

Вариант осуществления 48. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 47, где концентрация PCSK9-связывающего полипептида составляет приблизительно 210 мг/мл.

Вариант осуществления 49. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 41-48, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ.

Вариант осуществления 50. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 49, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 мМ до приблизительно 170 мМ.

Вариант осуществления 51. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 50, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ.

Вариант осуществления 52. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41 или 42, где буфер выбран из группы, состоящей из ацетатного, глутаматного, гистидинового и фосфатного буферов или их комбинации.

Вариант осуществления 53. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 52, где буфер присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ.

Вариант осуществления 54. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 53, где буфер представляет собой ацетат натрия и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 55. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 41 или 42, где значение pH составляет от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9.

Вариант осуществления 56. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 55, где значение pH составляет приблизительно 5,4.

Вариант осуществления 57. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41 или 42, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликольоктилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS).

Вариант осуществления 58. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 57, где поверхностно-активное вещество присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1% (вес/объем).

Вариант осуществления 59. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 57, где поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

Вариант осуществления 60. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41 или 42, дополнительно содержащая пролин.

Вариант осуществления 61. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 60, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 62. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 61, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 90 мМ до приблизительно 120 мМ.

Вариант осуществления 63. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 62, где пролин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 120 мМ.

Вариант осуществления 64. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41 или 42, где соль аргинина присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 65. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 64, где соль аргинина присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ.

Вариант осуществления 66. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 64, где соль аргинина представляет собой аргинин-НСI, аргинина ацетат или аргинина глутамат.

Вариант осуществления 67. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 66, где аргинин-НСI присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ.

Вариант осуществления 68. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 41-67, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 2 лет, если хранится при приблизительно  $-30^{\circ}\text{C}$  или ниже.

Вариант осуществления 69. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 68, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 5 лет.

Вариант осуществления 70. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 41-67, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, если хранится при приблизительно  $5^{\circ}\text{C}$ .

Вариант осуществления 71. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 70, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 24 месяцев.

Вариант осуществления 72. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 41-67, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$ .

Вариант осуществления 73. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 72, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно трех месяцев.

Вариант осуществления 74. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 73, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев.

Вариант осуществления 75. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 41-67, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно  $40^{\circ}\text{C}$ .

Вариант осуществления 76. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 41-75, где композиция содержит высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида на уровне менее приблизительно 3% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 77. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 76, где высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида присутствуют на уровне менее приблизительно 2,5% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 78. Фармацевтическая композиция, содержащая:

а) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остат-

ков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

- 1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и
- 2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и
- 3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

- b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ;
- c) аргинин-HCl, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ;
- d) полиоксидиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем); и
- e) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 79. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 78, где фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7.

Вариант осуществления 80. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 78 или 79, где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 50 сП (измеренной, например, с помощью реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)).

Вариант осуществления 81. Фармацевтическая композиция, содержащая:

a) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

- 1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и
- 2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

b) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

c) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ;

d) аргинин-HCl, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ;

e) полиоксидиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015%; и

f) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 82. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 81, где фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7.

Вариант осуществления 83. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 81 или 82, где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 80 сП (измеренной, например, с помощью реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)).

Вариант осуществления 84. Фармацевтическая композиция, содержащая:

a) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей при-

близительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ;

c) аргинин-HCl, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 70 мМ;

d) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем); и

e) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 85. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 84, где фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7.

Вариант осуществления 86. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 84 или 85, где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 45 сП (измеренной, например, с помощью реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)).

Вариант осуществления 87. Фармацевтическая композиция, содержащая:

a) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

- b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 170 мМ;
- c) аргинин-НСI, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ;
- d) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015%; и
- e) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 88. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 87, где фармацевтическая композиция характеризуется значением рН, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7.

Вариант осуществления 89. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 87 или 88, где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 60 сП (измеренной, например, с помощью реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)).

Вариант осуществления 90. Фармацевтическая композиция, содержащая:

a) PCSK9-связывающий полипептид, который присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 195-225 мг/мл, выбранный из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволюкумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие

определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR;

b) N-ацетиларгинин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ;

c) пролин, присутствующий при концентрации, составляющей приблизительно 120 мМ;

d) полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) при концентрации, составляющей от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем); и

e) ацетат натрия при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 91. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 90, где фармацевтическая композиция характеризуется значением рН, составляющим от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,7.

Вариант осуществления 92. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 90 или 91, где фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью, составляющей по меньшей мере менее приблизительно 60 сП (измеренной, например, с помощью реометра AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)).

Вариант осуществления 93. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 78-92, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 2 лет, если хранится при приблизительно -30°C или ниже.

Вариант осуществления 94. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 93, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 5 лет.

Вариант осуществления 95. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 78-92, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, если хранится при приблизительно 5°C.

Вариант осуществления 96. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 95, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 24 месяцев.

Вариант осуществления 97. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 78-92, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно 25°C.

Вариант осуществления 98. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 97, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно трех месяцев.

Вариант осуществления 99. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 98, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев.

Вариант осуществления 100. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 78-92, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно 40°C.

Вариант осуществления 101. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 78-92, где композиция содержит высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида на уровне менее приблизительно 3% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 102. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 101, где высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида присутствуют на уровне менее приблизительно 2,5% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 103. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-102, где фармацевтическая композиция является жидкой.

Вариант осуществления 104. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 1-103.

Вариант осуществления 105. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 1-103 и устройство для доставки выбранное из группы, состоящей из шприца, шприца-ручки, нательного инъектора и автоинъектора.

Вариант осуществления 106. Набор по варианту осуществления 105, дополнительно содержащий инструкции для введения фармацевтической композиции с применением устройства для доставки.

Вариант осуществления 107. Способ получения PCSK9-связывающего полипептида в фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере 140 мг/мл PCSK9-связывающего полипептида, предусматривающий добавление к фармацевтической композиции, содержащей PCSK9-связывающий полипептид, эффективного количества N-ацетиларгинина, вследствие чего вязкость фармацевтической композиции снижается по сравнению с фармацевтической композицией, не содержащей N-ацетиларгинин, и где PCSK9-связывающий полипептид выбран из группы, состоящей из:

а) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

б) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

с) моноклонального антитела, содержащего:

i) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

ii) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

д) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238; и

е) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

iii) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1;

и

iv) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

v) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGF-A из LDLR.

Вариант осуществления 108. Способ по варианту осуществления 107, где вязкость фармацевтической композиции составляет менее 80 сП (измеренная, например, с помощью реометра, такого как реометр AESR-G2 с системой конус-плоскость от TA Instruments (Нью-Касл, Делавэр)).

Вариант осуществления 109. Способ по варианту осуществления 108, где вязкость фармацевтиче-

ской композиции составляет менее 50 сП.

Вариант осуществления 110. Способ по любому из вариантов осуществления 107-109, где фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм/кг.

Вариант осуществления 111. Способ по варианту осуществления 110, где фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей приблизительно 300 мОсм/кг.

Вариант осуществления 112. Способ по варианту осуществления 111, где фармацевтическая композиция является изотонической для клетки крови человека.

Вариант осуществления 113. Способ по варианту осуществления 107, где PCSK9-связывающий полипептид присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 180 мг/мл до приблизительно 260 мг/мл.

Вариант осуществления 114. Способ по варианту осуществления 113, где концентрация PCSK9-связывающего полипептида составляет приблизительно 210 мг/мл.

Вариант осуществления 115. Способ по любому из вариантов осуществления 107-114, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ.

Вариант осуществления 116. Способ по варианту осуществления 115, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 мМ до приблизительно 170 мМ.

Вариант осуществления 117. Способ по варианту осуществления 115, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ.

Вариант осуществления 118. Способ по любому из вариантов осуществления 107-117, дополнительно предусматривающий буфер.

Вариант осуществления 119. Способ по варианту осуществления 118, где буфер выбран из группы, состоящей из ацетатного, глутаматного, гистидинового и фосфатного буферов или их комбинации.

Вариант осуществления 120. Способ по варианту осуществления 119, где буфер присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ.

Вариант осуществления 121. Способ по варианту осуществления 120, где буфер представляет собой ацетат натрия и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 122. Способ по любому из вариантов осуществления 107-121, где значение pH составляет от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9.

Вариант осуществления 123. Способ по варианту осуществления 122, где значение pH составляет приблизительно 5,4.

Вариант осуществления 124. Способ по любому из вариантов осуществления 107-123, дополнительно предусматривающий поверхностно-активное вещество.

Вариант осуществления 125. Способ по варианту осуществления 124, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликоль-октилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS).

Вариант осуществления 126. Способ по варианту осуществления 125, где поверхностно-активное вещество присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% (вес/объем) до приблизительно 1,0% (вес/объем).

Вариант осуществления 127. Способ по варианту осуществления 126, где поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

Вариант осуществления 128. Способ по любому из вариантов осуществления 107-127, дополнительно предусматривающий пролин.

Вариант осуществления 129. Способ по варианту осуществления 128, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 130. Способ по варианту осуществления 129, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 90 мМ до приблизительно 120 мМ.

Вариант осуществления 131. Способ по варианту осуществления 130, где пролин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 120 мМ.

Вариант осуществления 132. Способ по любому из вариантов осуществления 107-131, дополнительно предусматривающий соль аргинина.

Вариант осуществления 133. Способ по варианту осуществления 132, где соль аргинина присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 134. Способ по варианту осуществления 133, где соль аргинина присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ.

Вариант осуществления 135. Способ по варианту осуществления 133, где соль аргинина представляет собой аргинин-НСl, аргинина ацетат или аргинина глутамат.

Вариант осуществления 136. Способ по варианту осуществления 135, где аргинин-НСl присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 50 мМ.

Вариант осуществления 137. Способ по любому из вариантов осуществления 107-136, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 2 лет, если хранится при приблизительно -30 °С или ниже.

Вариант осуществления 138. Способ по варианту осуществления 137, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 5 лет.

Вариант осуществления 139. Способ по любому из вариантов осуществления 107-136, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, если хранится при приблизительно 5°С.

Вариант осуществления 140. Способ по варианту осуществления 139, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 24 месяцев.

Вариант осуществления 141. Способ по любому из вариантов осуществления 107-136, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно 25°С.

Вариант осуществления 142. Способ по варианту осуществления 141, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно трех месяцев.

Вариант осуществления 143. Способ по варианту осуществления 142, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев.

Вариант осуществления 144. Способ по любому из вариантов осуществления 107-136, где PCSK9-связывающий полипептид является стабильным в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, если хранится при приблизительно 40°С.

Вариант осуществления 145. Способ по любому из вариантов осуществления 107-136, где композиция содержит высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида на уровне менее приблизительно 3% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 146. Способ по варианту осуществления 145, где высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида присутствуют на уровне менее приблизительно 2,5% от концентрации PCSK9-связывающего полипептида.

Вариант осуществления 147. Способ составления терапевтического полипептида, предусматривающий:

а) первую стадию концентрирования, на которой полипептид в первом растворе концентрируют;  
б) первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй раствор, содержащий N-ацетиларгинин, с применением диафильтрации;

с) вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют;  
д) вторую стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин, с применением диафильтрации; и

е) третью стадию концентрирования, на которой полипептид в третьем растворе концентрируют; где терапевтический полипептид предусматривает PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR и выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

i) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, D238;

ii) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

- 3) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и
- 4) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и
- 5) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGFA из LDLR.

Вариант осуществления 148. Способ по варианту осуществления 147, где PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR, представляет собой моноклональное антитело, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR):

- а) CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно; и
- б) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

Вариант осуществления 149. Способ по варианту осуществления 147, где перед третьей стадией концентрирования температуру раствора, содержащего полипептид, повышают от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C.

Вариант осуществления 150. Способ по варианту осуществления 147, где первую стадию замены раствора проводят с применением по меньшей мере трех диаобъемов второго раствора.

Вариант осуществления 151. Способ по варианту осуществления 147, где вторую стадию замены раствора проводят с применением по меньшей мере четырех диаобъемов третьего раствора.

Вариант осуществления 152. Способ по варианту осуществления 147, где начальная концентрация терапевтического белка составляет приблизительно 11 мг/мл или меньше.

Вариант осуществления 153. Способ по варианту осуществления 147, где на первой стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз.

Вариант осуществления 154. Способ по варианту осуществления 153, где повышенная концентрация полипептида составляет от приблизительно 35 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл.

Вариант осуществления 155. Способ по варианту осуществления 147, где на второй стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 2 до 4 раз относительно первой стадии концентрирования.

Вариант осуществления 156. Способ по варианту осуществления 155, где повышенная концентрация полипептида составляет приблизительно 140 мг/мл.

Вариант осуществления 157. Способ по варианту осуществления 147, где на третьей стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 1,5 до приблизительно 2 раз относительно второй стадии концентрирования.

Вариант осуществления 158. Способ по варианту осуществления 157, где повышенная концентрация полипептида составляет приблизительно 260 мг/мл.

Вариант осуществления 159. Способ по варианту осуществления 147, где терапевтический полипептид имеет конечную концентрацию, которая в по меньшей мере приблизительно 19-20 раз превышает начальную концентрацию терапевтического полипептида.

Вариант осуществления 160. Способ по варианту осуществления 159, где конечная концентрация терапевтического полипептида составляет приблизительно 210 мг/мл.

Вариант осуществления 161. Способ по варианту осуществления 147, где стадии концентрирования предусматривают ультрафильтрацию с периодической загрузкой.

Вариант осуществления 162. Способ по варианту осуществления 147, где второй раствор и третий раствор являются идентичными.

Вариант осуществления 163. Способ по варианту осуществления 147, где второй или третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин, содержит соль аргинина и буфер.

Вариант осуществления 164. Способ по варианту осуществления 163, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ; соль аргинина представляет собой Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат и присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ; и буфер представляет собой натрий-ацетатный буфер при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ.

Вариант осуществления 165. Способ по варианту осуществления 164, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 до приблизительно 170 мМ; Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 63 до приблизительно 70 мМ, и натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 166. Способ по варианту осуществления 164, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 167. Способ по варианту осуществления 164, где N-ацетиларгинин присут-

ствуется при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 70 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 168. Способ по варианту осуществления 164, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 170 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 169. Способ по варианту осуществления 165 или 166, дополнительно предусматривающий пролин, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 170. Способ по любому из вариантов осуществления 163-169, где второй или третий раствор характеризуется значением pH, составляющим от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9.

Вариант осуществления 171. Способ по варианту осуществления 170, где значение pH составляет приблизительно 5,4.

Вариант осуществления 172. Способ по варианту осуществления 147, где на первой и второй стадиях замены раствора применяют мембрану для диафильтрации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

- a) размера отверстий сетки, который превышает приблизительно 350 мкм, но меньше или равен приблизительно 500 мкм;
- b) площади живого сечения, которая превышает приблизительно 32%, но меньше или равна приблизительно 36% от площади мембраны;
- c) плотности сетки, составляющей менее приблизительно 16,2 нити/см, но больше или равной приблизительно 12,2 нити/см;
- d) диаметра нити, который превышает приблизительно 270 мкм, но меньше или равен приблизительно 340 мкм;
- e) базового веса, который превышает приблизительно 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равен 180 г/м<sup>2</sup>;
- f) толщины, которая превышает приблизительно 515 мкм, но меньше или равна приблизительно 610 мкм;
- g) загрузки мембраны, превышающей приблизительно 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной приблизительно 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и
- h) максимального давления подачи, составляющего приблизительно 60 psi.

Вариант осуществления 173. Способ по любому из вариантов осуществления 147-172, где поверхностно-активное вещество добавляют к третьему раствору после проведения концентрирования.

Вариант осуществления 174. Способ по варианту осуществления 173, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликоль-октилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D-α-токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS), и присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1%.

Вариант осуществления 175. Способ по варианту осуществления 175, где поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

Вариант осуществления 176. Способ составления терапевтического полипептида, предусматривающий:

- a) первую стадию концентрирования, на которой полипептид в первом растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;
- b) первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй раствор, содержащий N-ацетиларгинин, соль аргинина и буфер, с применением диафильтрации и трех диаобъемов второго раствора;
- c) вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;
- d) вторую стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор, содержащий N-ацетиларгинин, соль аргинина и буфер, с применением диафильтрации и четырех диаобъемов третьего раствора;
- e) температуру раствора, содержащего полипептид, повышают от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C после второй стадии замены раствора; и
- f) третью стадию концентрирования, на которой полипептид дополнительно концентрируют с применением концентрирования с помощью ультрафильтрации с периодической загрузкой;

где на первой и второй стадиях замены раствора можно применять мембрану для диафильтрации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

g) размера отверстий сетки, который превышает приблизительно 350 мкм, но меньше или равен приблизительно 500 мкм;

h) площади живого сечения, которая превышает приблизительно 32%, но меньше или равна приблизительно 36% от площади мембраны;

i) плотности сетки, составляющей менее приблизительно 16,2 нити/см, но больше или равной приблизительно 12,2 нити/см;

j) диаметра нити, который превышает приблизительно 270 мкм, но меньше или равен приблизительно 340 мкм;

k) базового веса, который превышает приблизительно 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равен 180 г/м<sup>2</sup>;

l) толщины, которая превышает приблизительно 515 мкм, но меньше или равна приблизительно 610 мкм;

m) загрузки мембраны, превышающей приблизительно 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной приблизительно 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и

n) максимального давления подачи, составляющего приблизительно 60 psi; и

где терапевтический полипептид предусматривает PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR и выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

3) где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGFA из LDLR.

Вариант осуществления 177. Способ по варианту осуществления 176, где перед третьей стадией концентрирования температуру раствора, содержащего полипептид, повышают от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C.

Вариант осуществления 178. Способ по варианту осуществления 176, где начальная концентрация терапевтического белка составляет 11 мг/мл или меньше.

Вариант осуществления 179. Способ по варианту осуществления 176, где на первой стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз.

Вариант осуществления 180. Способ по варианту осуществления 179, где повышенная концентрация полипептида составляет от приблизительно 35 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл.

Вариант осуществления 181. Способ по варианту осуществления 176, где на второй стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 2 до 4 раз относительно первой стадии концентрирования.

Вариант осуществления 182. Способ по варианту осуществления 181, где повышенная концентрация полипептида составляет приблизительно 140 мг/мл.

Вариант осуществления 183. Способ по варианту осуществления 176, где на третьей стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается в от приблизительно 1,5 до приблизительно 2 раз относительно второй стадии концентрирования.

Вариант осуществления 184. Способ по варианту осуществления 183, где повышенная концентрация полипептида составляет приблизительно 260 мг/мл.

Вариант осуществления 185. Способ по варианту осуществления 176, где терапевтический поли-

пептид имеет конечную концентрацию, которая в по меньшей мере приблизительно 19-20 раз превышает начальную концентрацию терапевтического полипептида.

Вариант осуществления 186. Способ по варианту осуществления 185, где конечная концентрация терапевтического полипептида составляет приблизительно 210 мг/мл.

Вариант осуществления 187. Способ по варианту осуществления 176, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ; соль аргинина представляет собой Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат и присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, и буфер представляет собой натрий-ацетатный буфер при концентрации, составляющей от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ.

Вариант осуществления 188. Способ по варианту осуществления 188, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 140 до приблизительно 170 мМ; Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 63 до приблизительно 70 мМ, и натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 189. Способ по варианту осуществления 188, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 140 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 190. Способ по варианту осуществления 188, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 155 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 70 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 191. Способ по варианту осуществления 188, где N-ацетиларгинин присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 170 мМ, Arg-HCl, Arg ацетат или Arg глутамат присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 63 мМ, натрий-ацетатный буфер присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 10 мМ.

Вариант осуществления 192. Способ по варианту осуществления 176, дополнительно предусматривающий пролин, где пролин присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ.

Вариант осуществления 193. Способ по любому из вариантов осуществления 176-192, где второй или третий раствор характеризуется значением pH, составляющим от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,9.

Вариант осуществления 194. Способ по варианту осуществления 193, где значение pH составляет приблизительно 5,4.

Вариант осуществления 195. Способ по любому из вариантов осуществления 176-194, где поверхностно-активное вещество добавляют к третьему раствору после проведения концентрирования.

Вариант осуществления 196. Способ по варианту осуществления 195, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (полисорбата 80 или полисорбата 20), блок-сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полоксамеров, таких как Pluronic® F-68 и другие виды Pluronic®), сложных сорбитаналкиловых эфиров (Span®) полиэтиленгликоль-октилфениловых эфиров (Triton X-100), полиэтиленгликольалкиловых эфиров (Brij), полипропиленгликоль алкиловых эфиров, глюкозидалкиловых эфиров и D- $\alpha$ -токоферолполиэтиленгликольсукцината (витамина E TPGS), и присутствует при концентрации, составляющей от приблизительно 0,0001% до приблизительно 1%.

Вариант осуществления 197. Способ по варианту осуществления 196, где поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80) и присутствует при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

Вариант осуществления 198. Способ составления терапевтического полипептида, предусматривающий:

- a) первую стадию концентрирования, на которой полипептид в первом растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;
- b) первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй с применением диафильтрации и трех диаобъемов второго раствора;
- c) вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют с применением ультрафильтрации с периодической загрузкой;
- d) вторую стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор с применением диафильтрации и четырех диаобъемов третьего раствора;
- e) температуру раствора, содержащего полипептид, повышают от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C после второй стадии замены раствора; и
- f) третью стадию концентрирования, на которой полипептид дополнительно концентрируют с при-

менением концентрирования с помощью ультрафильтрации с периодической загрузкой;

г) в качестве альтернативы стадию добавления полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата при концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем) к раствору, полученному на третьей стадии концентрирования,

где второй и третий растворы предусматривают раствор, выбранный из группы, состоящей из раствора, содержащего приблизительно 140 мМ N-ацетиларгинина, приблизительно 50 мМ Arg-HCl и приблизительно 10 мМ ацетата натрия, при этом раствор характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 5,2; раствора, содержащего приблизительно 155 мМ N-ацетиларгинина, приблизительно 70 мМ Arg-HCl и приблизительно 10 мМ ацетата натрия, при этом раствор характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 5,4; и раствора, содержащего приблизительно 170 мМ N-ацетиларгинина, приблизительно 10 мМ ацетата натрия, при этом раствор характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 5,6;

где на первой и второй стадиях замены раствора можно применять мембрану для диализации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

h) размера отверстий сетки, который превышает приблизительно 350 мкм, но меньше или равен приблизительно 500 мкм;

i) площади живого сечения, которая превышает приблизительно 32%, но меньше или равна приблизительно 36% от площади мембраны;

j) плотности сетки, составляющей менее приблизительно 16,2 нити/см, но больше или равной приблизительно 12,2 нити/см;

к) диаметра нити, который превышает приблизительно 270 мкм, но меньше или равен приблизительно 340 мкм;

l) базового веса, который превышает приблизительно 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равна 180 г/м<sup>2</sup>;

m) толщины, которая превышает приблизительно 515 мкм, но меньше или равна приблизительно 610 мкм;

n) загрузки мембраны, превышающей приблизительно 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной приблизительно 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и

o) максимального давления подачи, составляющего приблизительно 60 psi; и

где терапевтический полипептид предусматривает PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR и выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента;

ii) моноклонального антитела, которое конкурирует с эволокумабом за связывание с PCSK9;

iii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR2 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 14 или 16; CDR3 тяжелой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 14 или 16, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1 легкой цепи, которая представляет собой CDR1 в SEQ ID NO: 15 или 17; CDR2 легкой цепи, которая представляет собой CDR2 в SEQ ID NO: 15 или 17; и CDR3 легкой цепи, которая представляет собой CDR3 в SEQ ID NO: 15 или 17;

iv) моноклонального антитела, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237, D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237, D238;

v) моноклонального антитела, которое связывается с PCSK9 в месте расположения на PCSK9 эпитопа, который перекрывается с эпитопом, который связывается антителом, содержащим:

1) переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1; и

2) переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, и

где эпитоп для моноклонального антитела дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен EGFA из LDLR.

Вариант осуществления 199. Способ по варианту осуществления 104, где субъект имеет заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из заболевания или нарушения, связанного с повышенным уровнем содержания холестерина, выбранного из группы, состоящей из семейной гиперхолестеринемии (включая гетерозиготную гиперхолестеринемию, гомозиготную гиперхолестеринемию, семейную гиперхолестеринемию с дефектным аполипопротеином В-100; полигенную гиперхолестеринемию, несемейную гиперхолестеринемию, гиперлипидемию, заболевания сердца, метаболического синдрома, диабета, ишемической болезни сердца, инсульта, сердечно-сосудистых заболеваний, болезни Альцгеймера и видов дислипидемии (включая первичную и вторичную дислипидемию, такие как метаболический синдром, сахарный диабет, семейная комбинированная гиперлипидемия, семейная гипертриг-

лицидемия; семейная дисбеталипопротеинемия, дефицит печеночной липазы; дислипидемия, вторичная для неразборчивости в питании, гипотиреоза, приема лекарственных средств, включая эстрогеновую и прогестинную терапию, бета-адреноблокаторы и тиазидные диуретики; нефротического синдрома, хронической почечной недостаточности, синдрома Кушинга, первичного билиарного цирроза, болезни накопления гликогена, гепатомы, холестаза, акромегалии, инсулиномы, изолированного дефицита гормона роста или алкогольной гипертриглицеридемии; атеросклеротического заболевания, выбранного из группы, состоящей из смерти по причине сердечно-сосудистой патологии, смерти не по причине сердечно-сосудистой патологии или смерти от всех причин, ишемической болезни сердца, коронарной недостаточности, заболевания периферических артерий, инсульта (ишемического и геморрагического), стенокардии, нарушения мозгового кровообращения и острого коронарного синдрома, инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии; и заболевания или нарушения, с которым можно бороться с применением статинов.

Вариант осуществления 200. Способ по варианту осуществления 104, где лечение субъекта предусматривает снижение риска развития состояния, выбранного из группы, состоящей из смертельного и несмертельного сердечного приступа, смертельного и несмертельного инсульта, операции на сердце, госпитализации по причине сердечной недостаточности, боли в груди у субъекта, имеющего заболевание сердца, и/или сердечно-сосудистых осложнений вследствие установленного заболевания сердца, сердечно-сосудистого состояния, обусловленного повышенным уровнем CRP или hsCRP, и рецидивирующего сердечно-сосудистого осложнения.

Вариант осуществления 201. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-103 для применения в качестве медицинского препарата.

Вариант осуществления 202. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 201, где медицинский препарат предназначен для применения в лечении заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из заболевания или нарушения, связанного с повышенным уровнем содержания холестерина, выбранного из группы, состоящей из семейной гиперхолестеринемии (включая гетерозиготную гиперхолестеринемию, гомозиготную гиперхолестеринемию, семейную гиперхолестеринемию с дефектным аполипопротеином В-100; полигенную гиперхолестеринемию), несемейной гиперхолестеринемии, гиперлипидемии, заболевания сердца, метаболического синдрома, диабета, ишемической болезни сердца, инсульта, сердечно-сосудистых заболеваний, болезни Альцгеймера и видов дислипидемии (включая первичную и вторичную дислипидемии, такие как метаболический синдром, сахарный диабет, семейная комбинированная гиперлипидемия, семейная гипертриглицеридемия; семейная дисбеталипопротеинемия, дефицит печеночной липазы; дислипидемия, вторичная для неразборчивости в питании, гипотиреоза, приема лекарственных средств, включая эстрогеновую и прогестинную терапию, бета-адреноблокаторы и тиазидные диуретики; нефротического синдрома, хронической почечной недостаточности, синдрома Кушинга, первичного билиарного цирроза, болезни накопления гликогена, гепатомы, холестаза, акромегалии, инсулиномы, изолированного дефицита гормона роста или алкогольной гипертриглицеридемии; атеросклеротического заболевания, выбранного из группы, состоящей из смерти по причине сердечно-сосудистой патологии, смерти не по причине сердечно-сосудистой патологии или смерти от всех причин, ишемической болезни сердца, коронарной недостаточности, заболевания периферических артерий, инсульта (ишемического и геморрагического), стенокардии, нарушения мозгового кровообращения и острого коронарного синдрома, инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии; и заболевания или нарушения, с которым можно бороться с применением статинов.

Вариант осуществления 203. Способ по варианту осуществления 202, где медицинский препарат предназначен для снижения риска развития состояния, выбранного из группы, состоящей из смертельного и несмертельного сердечного приступа, смертельного и несмертельного инсульта, операции на сердце, госпитализации по причине сердечной недостаточности, боли в груди у субъекта, имеющего заболевание сердца, и/или сердечно-сосудистых осложнений вследствие установленного заболевания сердца, сердечно-сосудистого состояния, обусловленного повышенным уровнем CRP или hsCRP, и рецидивирующего сердечно-сосудистого осложнения.

## Сокращения

Сокращение	Определение
Arg-HCl	Аргинин-HCl
ASC	Условия хранения при температуре окружающего воздуха
CDR	Определяющая комплементарность область
CEX	Катионообмен
DF	Диафильтрация
DIW	Деионизированная вода
DOE	План эксперимента
DS	Лекарственное вещество
DV	Диаобъем
EGF-A	Повтор А подобный эпидермальному фактору роста
EQ	Равновесие
FR	Каркасная область
HC	Тяжелая цепь (антитела)
HCVR	Варибельная область тяжелой цепи (антитела)
HDLC	Холестерин липопротеинов высокой плотности
HIAC	Обнаружение частиц, невидимых невооруженным глазом, с помощью светоблокировки
HMW	Высокомолекулярный
HPLC	Жидкостная хроматография высокого давления
HPLC-UV	Жидкостная хроматография высокого давления с ультрафиолетовым детектором
LC	Легкая цепь (антитела)
LCVR	Варибельная область легкой цепи (антитела)
LDL	Липопротеин низкой плотности
LDLR	Рецепторы липопротеинов низкой плотности
LMH	литры/м <sup>2</sup> /ч.
LM	Низкомолекулярный
mAb	Моноклональное антитело
MFI	Визуализация микропотока
NaOAc	Ацетат натрия
NAR	N-ацетиларгинин
NTU	Нефелометрическая единица мутности

OC	Сверхконцентрированный, сверхконцентрирование
PEG	Полиэтиленгликоль
PFS	Предварительно заполненный шприц
PVDF	Поливинилиденфторид
PW	Очищенная вода
rCE-SDS	Капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях
к. т.	Комнатная температура
SEC	Эксклюзионная хроматография
SE-HPLC	Эксклюзионная жидкостная хроматография высокого давления
TFF	Фильтрация в тангенциальном потоке
TMP	Трансмембранное давление
UF	Ультрафильтрация
UFDF	Ультрафильтрация/диафильтрация
UV	Ультрафиолет
VF	Фильтрация вирусов
VLDL-C	Холестерин липопротеинов очень низкой плотности
WFI	Вода для инъекций

#### Список литературы

Chan, J., Gibbs, J., Dias, C., Wasserman, S., Scott, R., Clogston, C., . . . Stein, E. (2012). Патентный документ Всемирной организации интеллектуальной собственности № WO2012154999.

Chothia, C., & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 196(4), 901-917.

Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., . . . et al. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342(6252), 877-883. doi: 10.1038/342877a0

Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., . . . Qiu, X. (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*, 14(5), 413-419. doi: 10.1038/nsmb1235

Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2007).

Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci*, 32(2), 71-77. doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.008

Jackson, S. M., Walker, N. P., Piper, D. E., Shan, B., Shen, W., Chan, J., . . . Carabeo, T. (2009). Патентный документ Всемирной организации интеллектуальной собственности № WO 2009/026558.

Kabat, E., Wu, T., Perry, H., Gottesman, K., & Foeller, C. (1991). *Sequences of proteins of immunological interest* (Vol. Publication No. 91-3242). Bethesda, MD: National Institutes of Health.

Kabat, E., Wu, T., Reid-Miller, M., Perry, H., & Gottesman, K. (1987). *Sequences of proteins of immunological interest* (4th ed. Vol. No. 165-492). Bethesda, MD: US Government Printing Office.

Morichika, T., & Kameoka, D. (2007). Патентный документ Всемирной организации интеллектуальной собственности № WO2007074880.

Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., . . . Walker, N. P. (2007). The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure*, 15(5), 545-552. doi: 10.1016/j.str.2007.04.004

Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., . . . Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3), 928-933. doi: 10.1073/pnas.0335507100

Seidah, N. G., & Prat, A. (2007). The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med (Berl)*, 85(7), 685-696. doi: 10.1007/s00109-007-0172-7

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:

а) по меньшей мере 140 мг/мл PCSK9-связывающего полипептида, который выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента; и

ii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и

b) от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ N-ацетиларгинина, и

c) по меньшей мере один компонент из числа соли аргинина или пролина,

где фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 80 сП.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где PCSK9-связывающий полипептид присутствует при концентрации, составляющей от 140 до 260 мг/мл.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где концентрация PCSK9-связывающего полипептида составляет 210 мг/мл.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, дополнительно содержащая буфер.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, дополнительно содержащая пролин.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6, дополнительно содержащая соль аргинина.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-7, где композиция содержит высокомолекулярные агрегаты или олигомеры PCSK9-связывающего полипептида на уровне менее 3% от концентра-

ции PCSK9-связывающего полипептида.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, где фармацевтическая композиция является жидкой.

10. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-9 в получении лекарственного средства для снижения холестерина в сыворотке у субъекта, представляющего собой человека.

11. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-9 в получении лекарственного средства для лечения нарушения, связанного с холестерином, у субъекта, представляющего собой человека, причем нарушение, связанное с холестерином, включает одно или более из следующего: семейная гиперхолестеринемия, несемейная гиперхолестеринемия, гиперлипидемия, болезнь сердца, метаболический синдром, диабет, ишемическая болезнь сердца, инсульт, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера, дислипидемия, сахарный диабет, семейная комбинированная гиперлипидемия, семейная гипертриглицеридемия, семейная гиперхолестеринемия, гетерозиготная гиперхолестеринемия, гомозиготная гиперхолестеринемия, семейный дефект апополипротеина В-100, синдром полигенной гиперхолестеринемии, нефротический синдром, хроническая почечная недостаточность, синдром Кушинга, первичный билиарный цирроз, болезнь накопления гликогена, гепатома, холестаз, акромегалия, инсулинома, изолированный дефицит гормона роста, алкогольная гипертриглицеридемия или дислипидемия, вторичная по отношению к любому из следующих факторов: несоблюдение диеты, гипотиреоз, лекарственные препараты, бета-блокаторы и тиазидные диуретики.

12. Набор для лечения нарушения, связанного с холестерином, у субъекта, представляющего собой человека, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп.1-9 и устройство для доставки, выбранное из группы, состоящей из шприца, шприца-ручки, нательного инъектора и автоинъектора.

13. Способ получения PCSK9-связывающего полипептида в фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере 140 мг/мл PCSK9-связывающего полипептида, включающий добавление к фармацевтической композиции, содержащей PCSK9-связывающий полипептид, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ N-ацетиларгинина и по меньшей мере один компонент из числа соли аргинина или пролина, вследствие чего вязкость фармацевтической композиции снижается по сравнению с фармацевтической композицией, не содержащей N-ацетиларгинин, и где PCSK9-связывающий полипептид выбран из группы, состоящей из:

а) моноклонального антитела, содержащего полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента; и

б) моноклонального антитела, содержащего:

i) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, и

ii) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; где фармацевтическая композиция имеет вязкость менее 80 сП.

14. Способ получения терапевтического полипептида, включающий:

а) первую стадию замены раствора, на которой для концентрированного полипептида в первом растворе выполняют замену на второй раствор, содержащий N-ацетиларгинин, с использованием диафильтрации;

б) вторую стадию концентрирования, на которой полипептид во втором растворе концентрируют;

с) третью стадию замены раствора, на которой для полипептида в концентрированном втором растворе выполняют замену на третий раствор, содержащий от приблизительно 25 мМ до приблизительно 230 мМ N-ацетиларгинина, с использованием диафильтрации; и

д) четвертую стадию концентрирования, на которой полипептид в третьем растворе концентрируют; где терапевтический полипептид предусматривает PCSK9-связывающий полипептид, который блокирует связывание PCSK9 с LDLR и выбран из группы, состоящей из:

i) моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (эволокумаб), или его антигенсвязывающего фрагмента; и

ii) моноклонального антитела, содержащего:

1) полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность области (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, и

2) полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

15. Способ по п.14, где перед третьей стадией концентрирования температуру раствора, содержащего полипептид, повышают от 25°C до 37°C.

16. Способ по п.14, где на первой стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается от 3 до 7 раз.

17. Способ по п.14, где на второй стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается от 2 до 4 раз относительно первой стадии концентрирования.

18. Способ по п.14, где на третьей стадии концентрирования концентрация терапевтического полипептида повышается от 1,5 до 2 раз относительно второй стадии концентрирования.

19. Способ по п.14, где терапевтический полипептид имеет конечную концентрацию, которая в по меньшей мере 19-20 раз превышает начальную концентрацию терапевтического полипептида.

20. Способ по п.14, где стадии концентрирования включают ультрафильтрацию с периодической загрузкой.

21. Способ по любому из пп.14-19, где второй или третий раствор имеет pH от 4,8 до 6,9.

22. Способ по п.14, где на первой и второй стадиях замены раствора используют мембрану для диализации, имеющую по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из:

a) размера отверстий сетки, который превышает 350 мкм, но меньше или равен 500 мкм;

b) площади живого сечения, которая превышает 32%, но меньше или равна 36% от площади мембраны;

c) плотности сетки, составляющей менее 16,2 нити/см, но больше или равной 12,2 нити/см;

d) диаметра нити, который превышает 270 мкм, но меньше или равен 340 мкм;

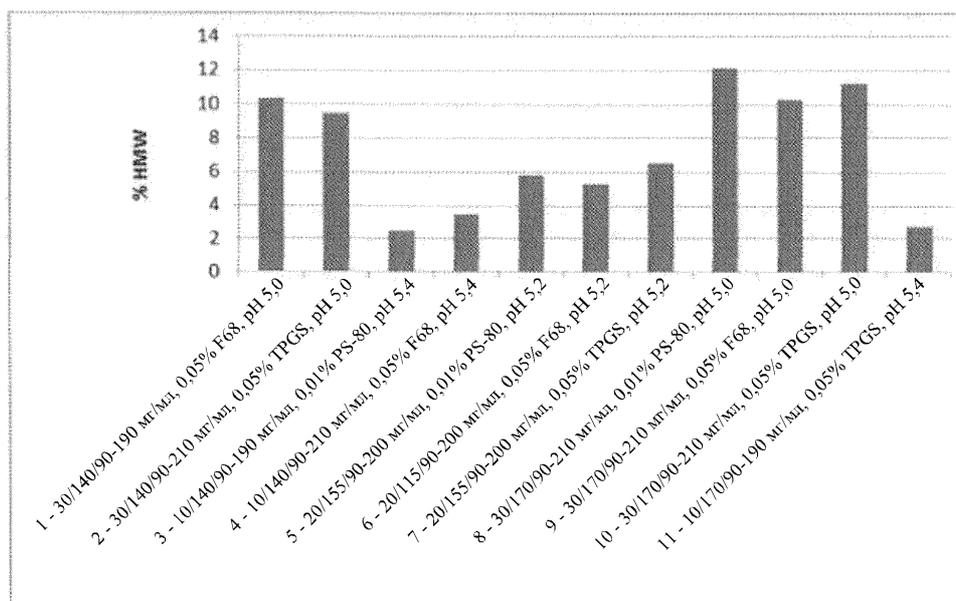
e) базового веса, который превышает 160 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равен 180 г/м<sup>2</sup>;

f) толщины, которая превышает 515 мкм, но меньше или равна 610 мкм;

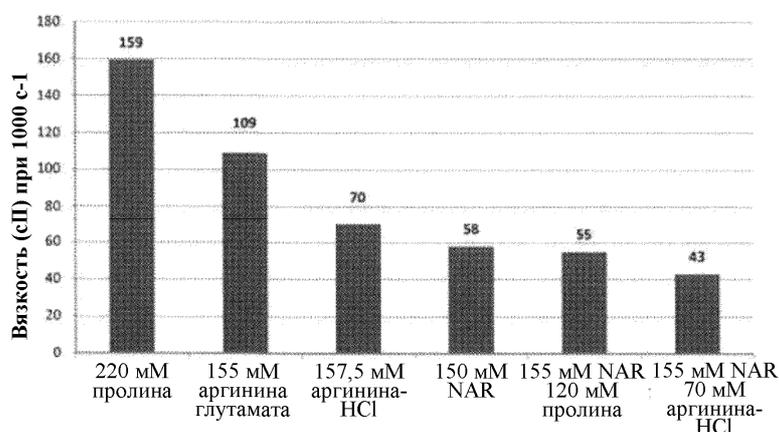
g) загрузки мембраны, превышающей 1138,1 г/м<sup>2</sup>, но меньше или равной 1919,3 г/м<sup>2</sup>; и

h) максимального давления подачи, составляющего 60 psi.

23. Способ по любому из пп.14-22, где поверхностно-активное вещество добавляют к третьему раствору после проведения концентрирования.

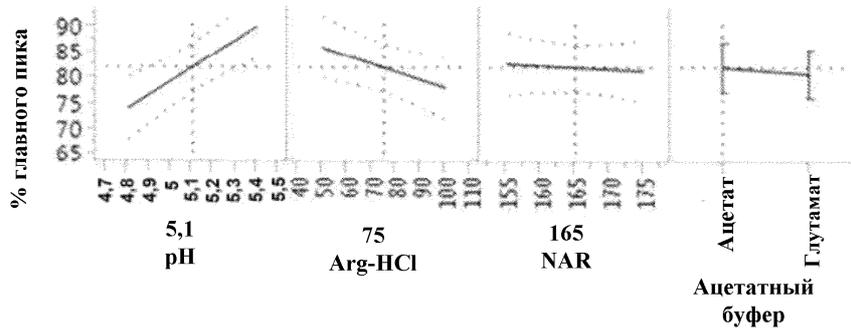


Фиг. 1

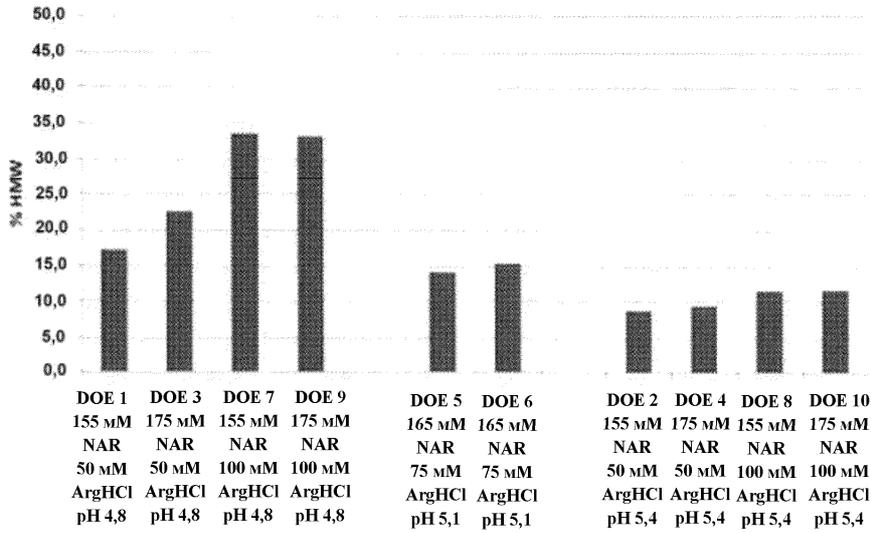
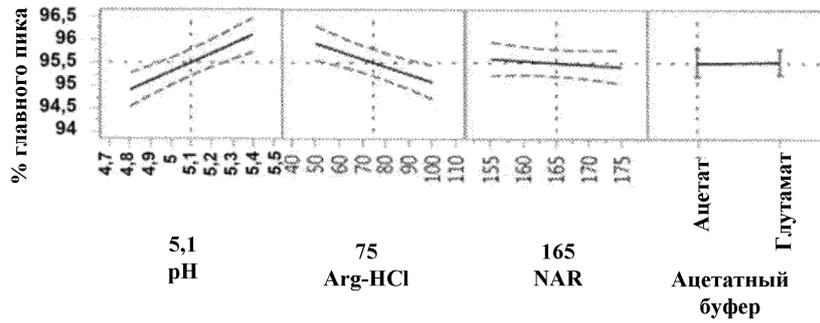


Фиг. 2

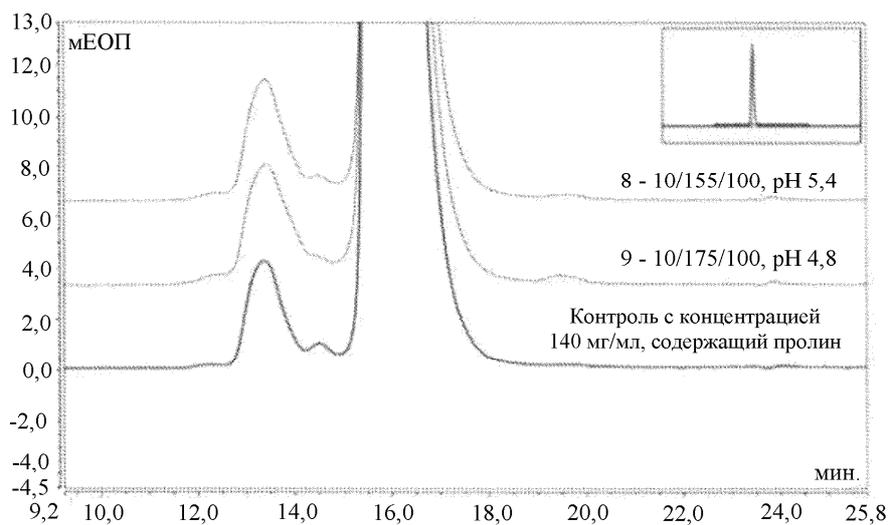
40°C – 1 месяц



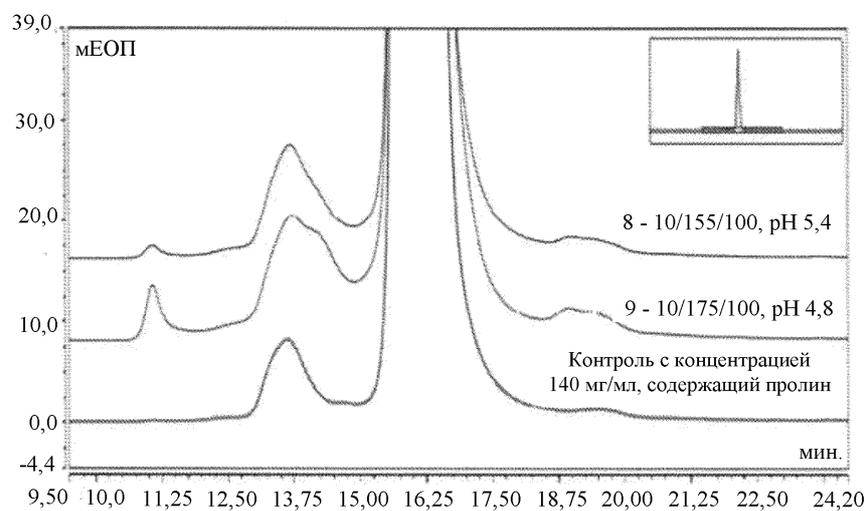
25°C – 3 месяца



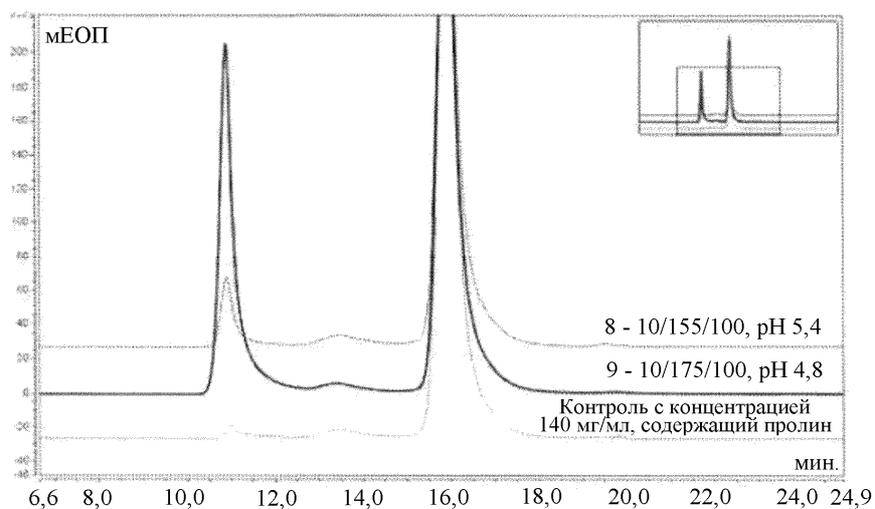
Фиг. 4



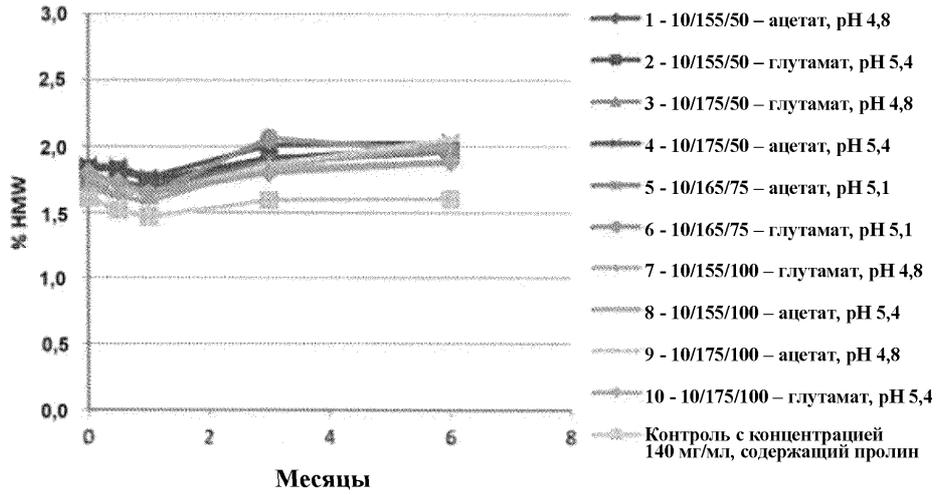
Фиг. 5А



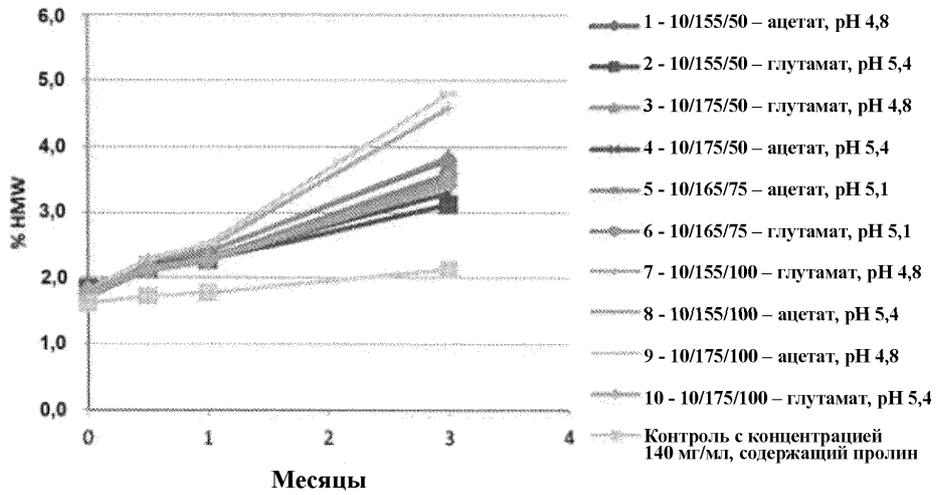
Фиг. 5В



Фиг. 5С

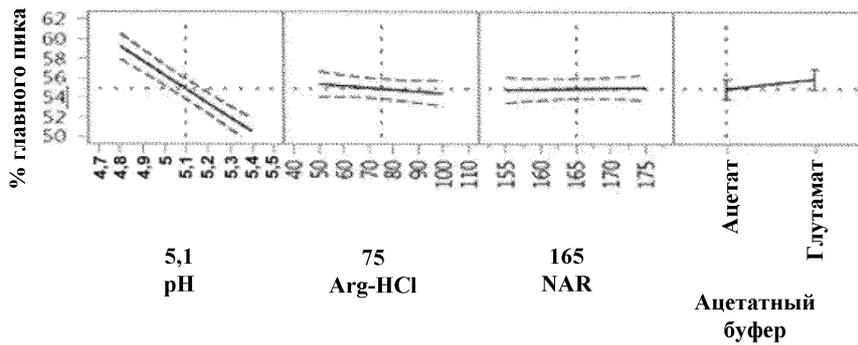


Фиг. 6А



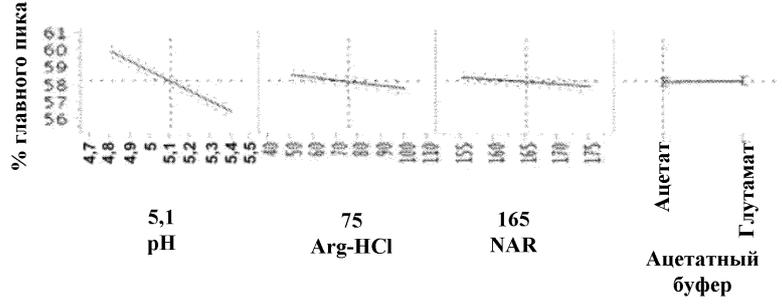
Фиг. 6В

40°C – 1 месяц

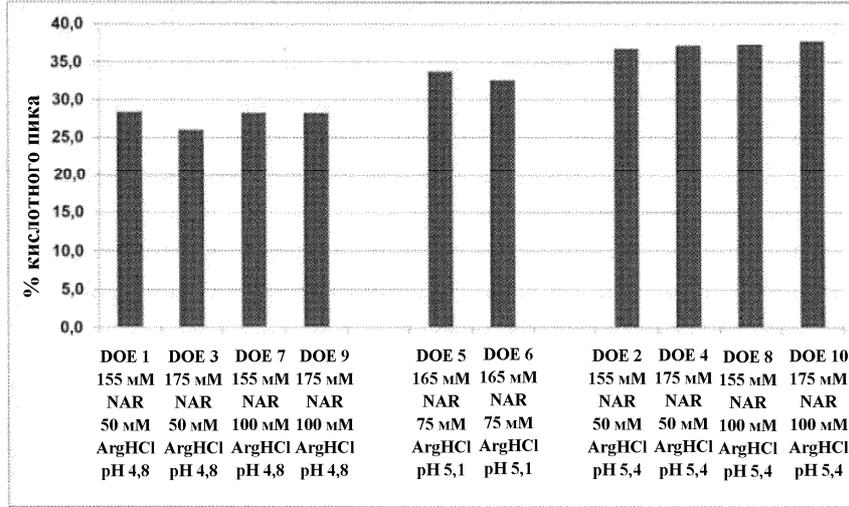


Фиг. 7А

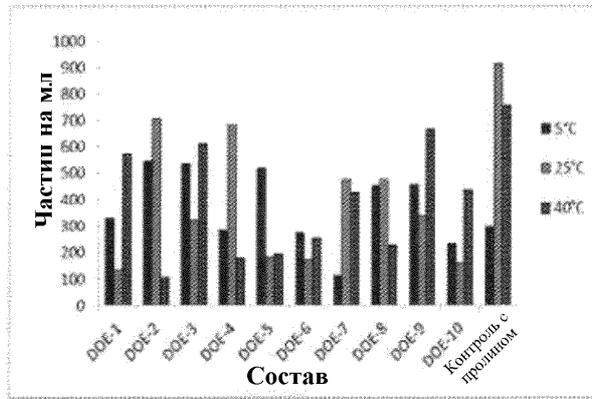
25°C – 3 месяца



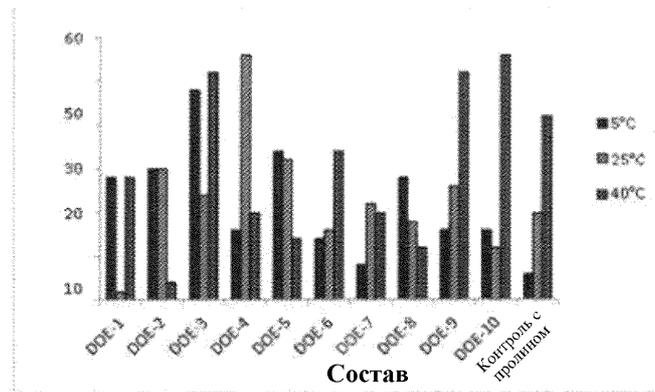
Фиг. 7В



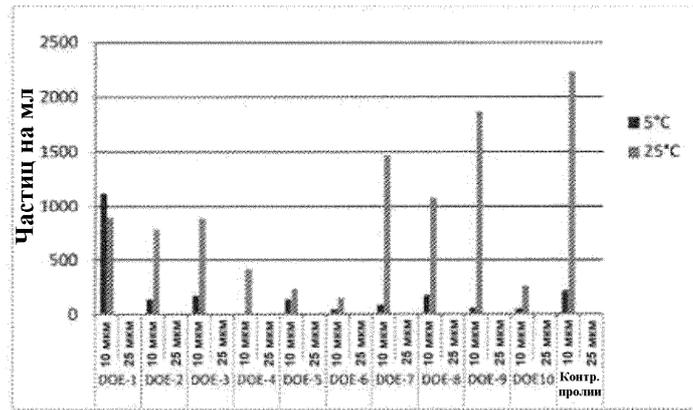
Фиг. 8



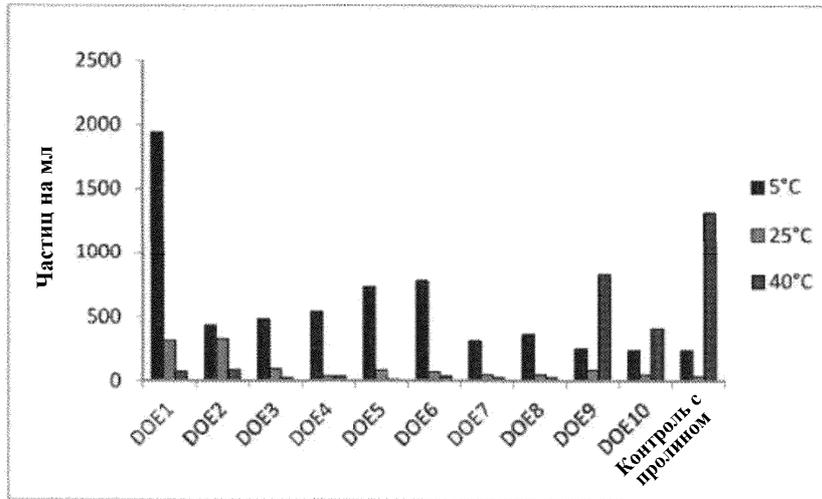
Фиг. 9А



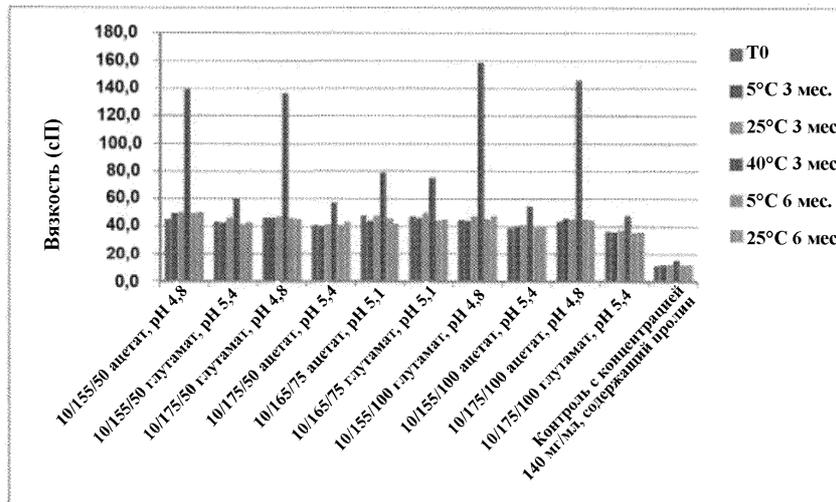
Фиг. 9В



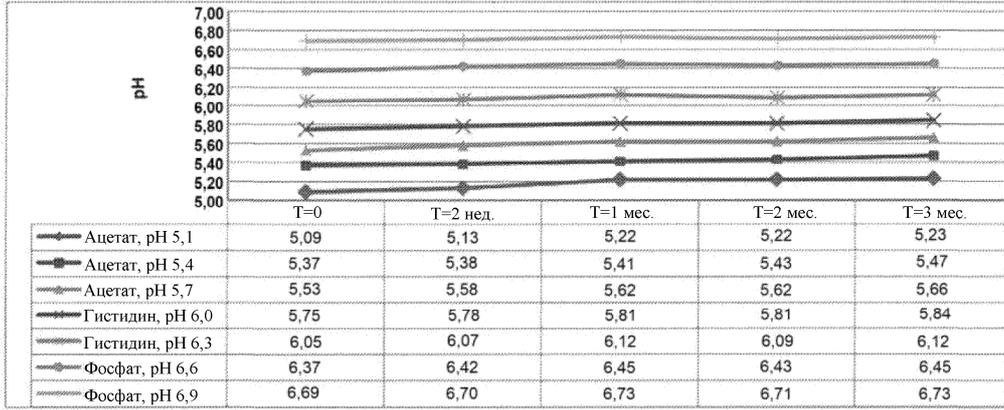
Фиг. 9С



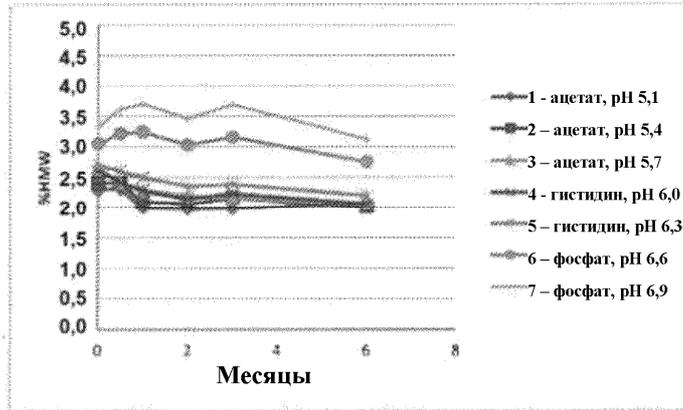
Фиг. 10



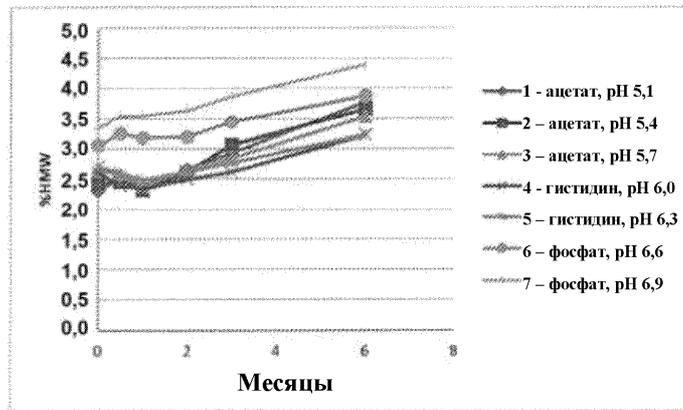
Фиг. 11



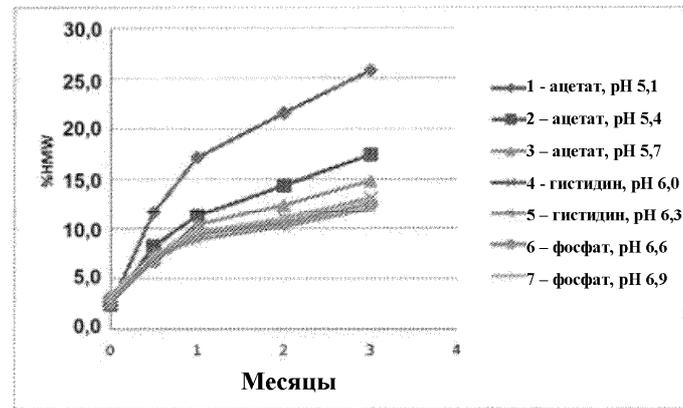
Фиг. 12



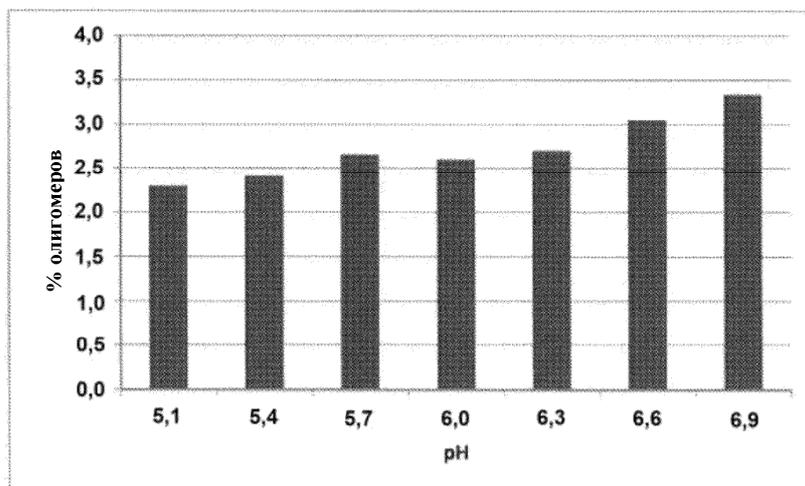
Фиг. 13А



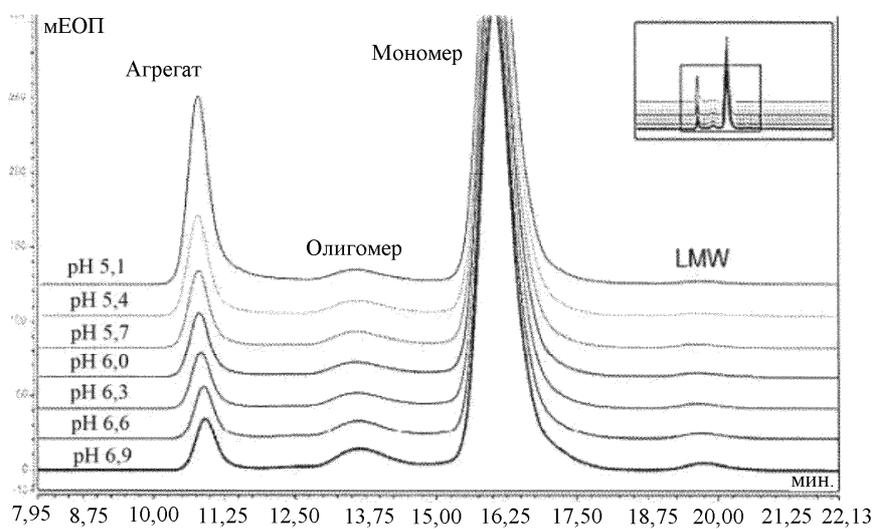
Фиг. 13В



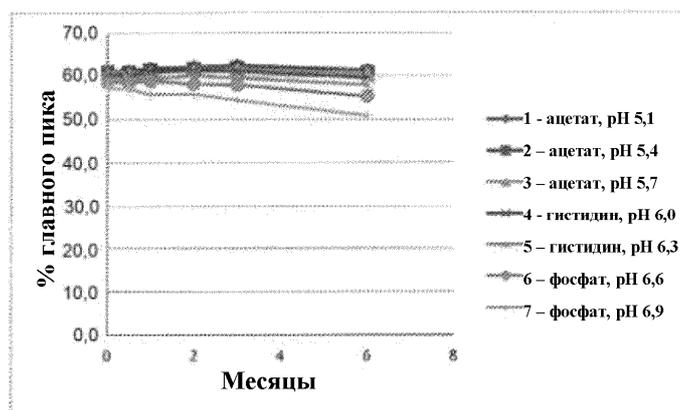
Фиг. 13С



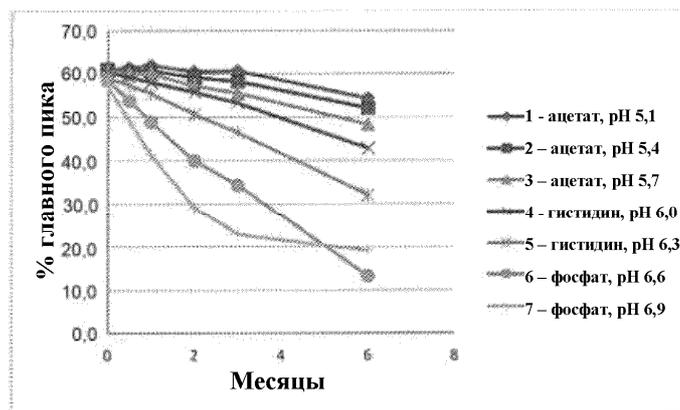
Фиг. 14



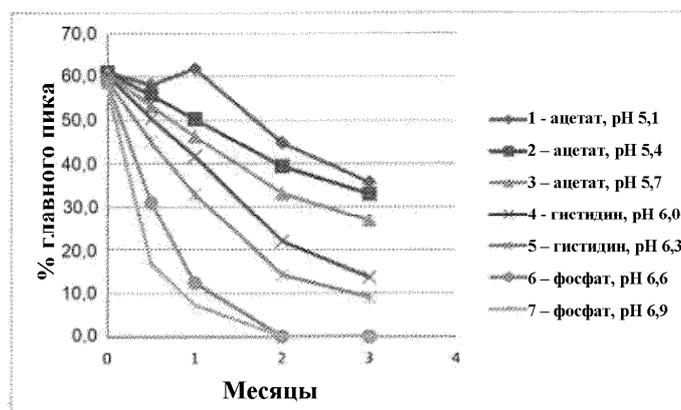
Фиг. 15



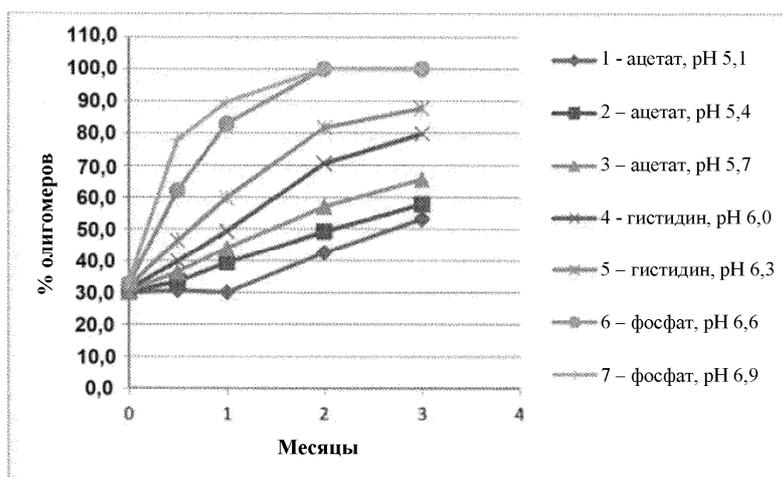
Фиг. 16А



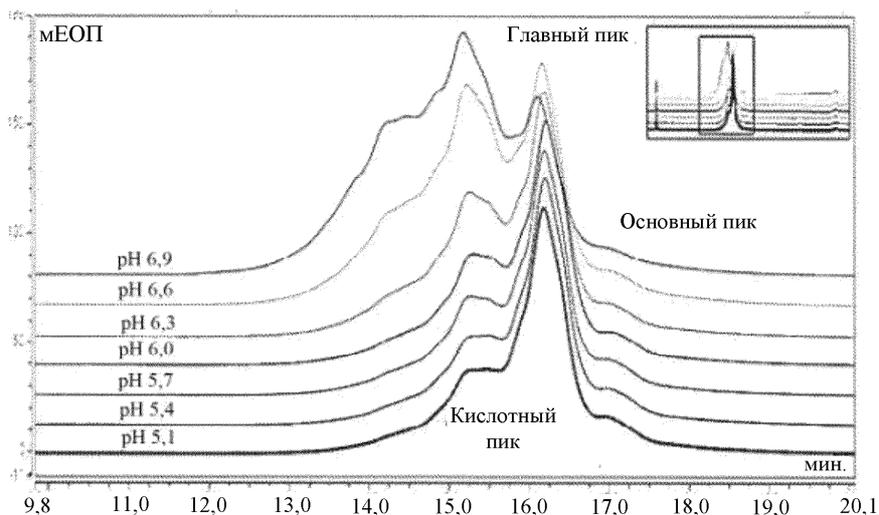
Фиг. 16В



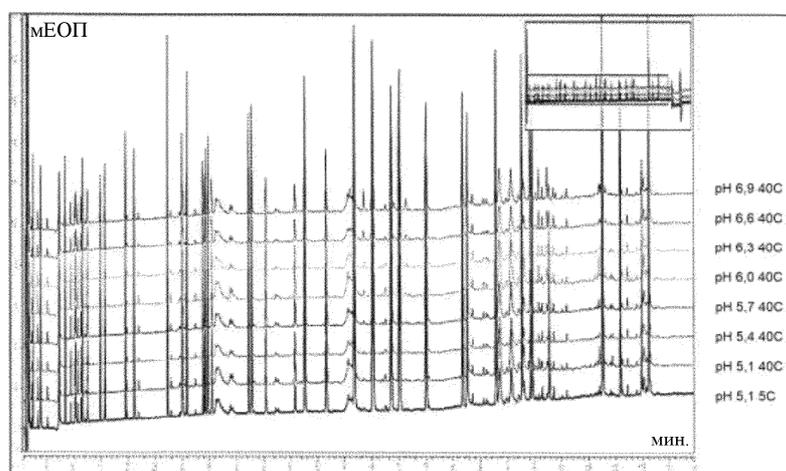
Фиг. 16С



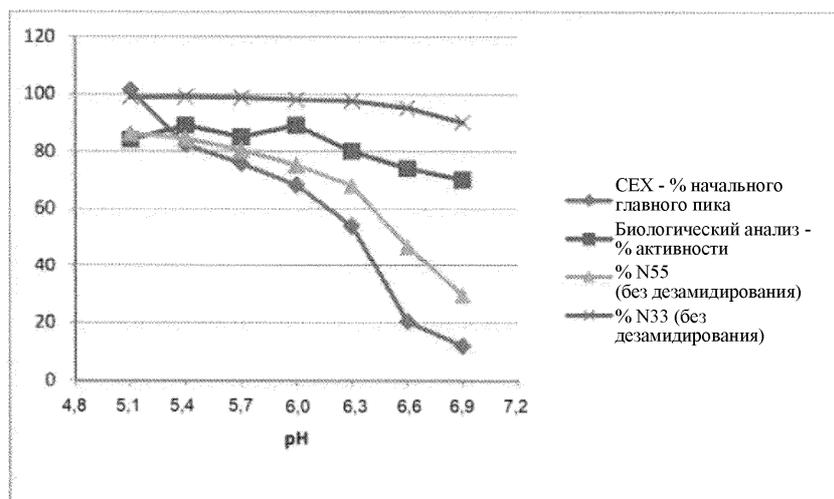
Фиг. 17



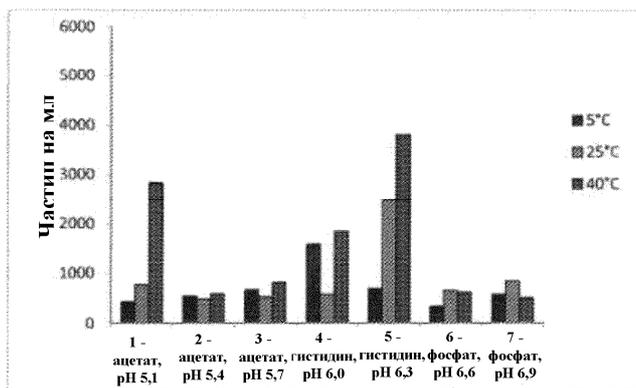
Фиг. 18



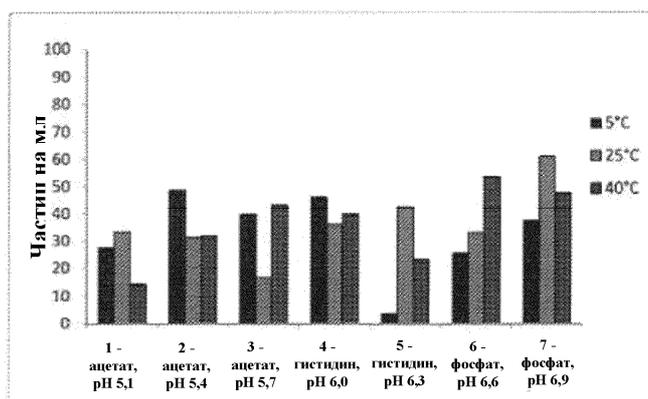
Фиг. 19



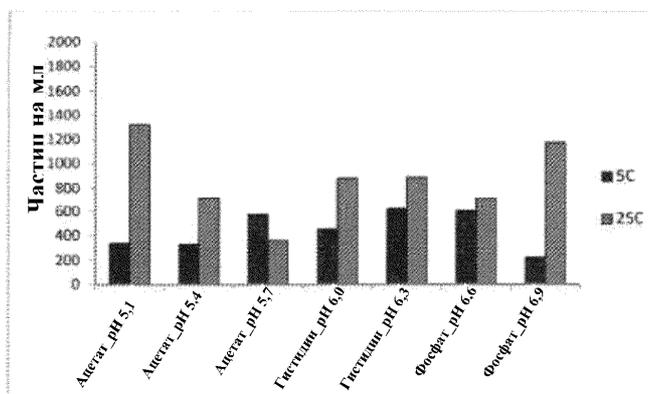
Фиг. 20



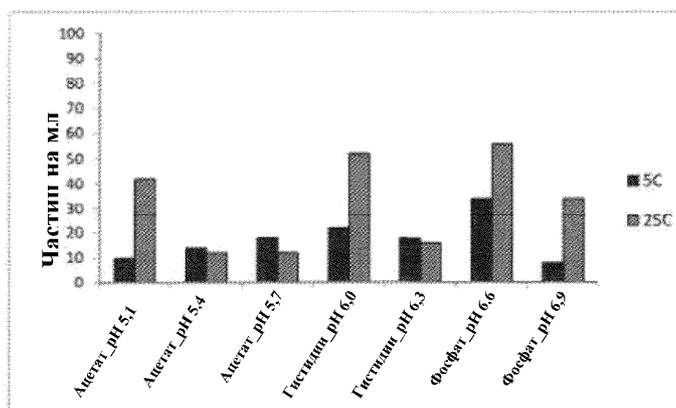
Фиг. 21А



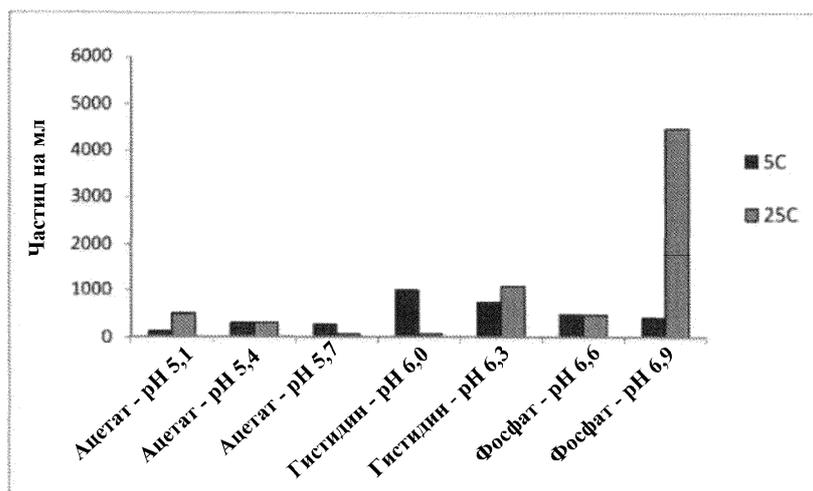
Фиг. 21В



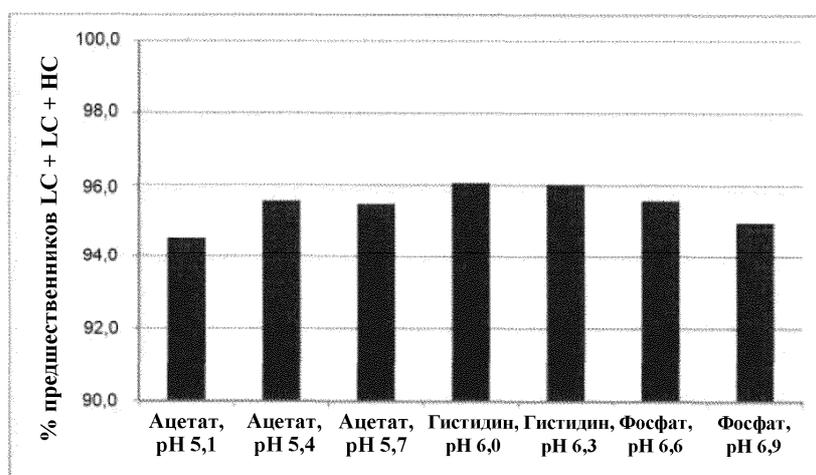
Фиг. 21С



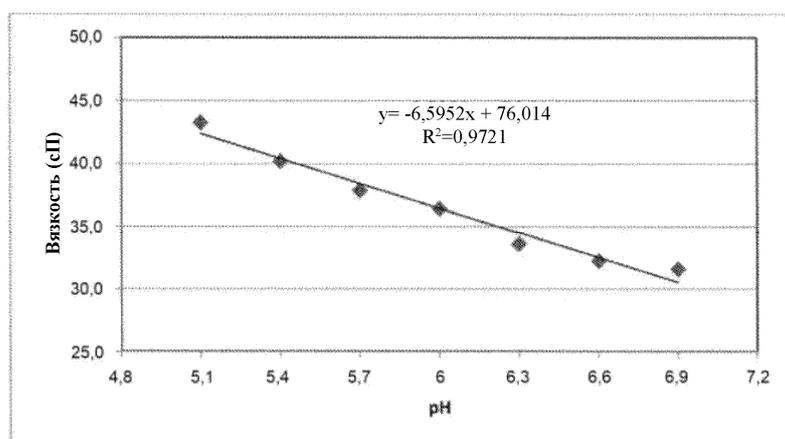
Фиг. 21D



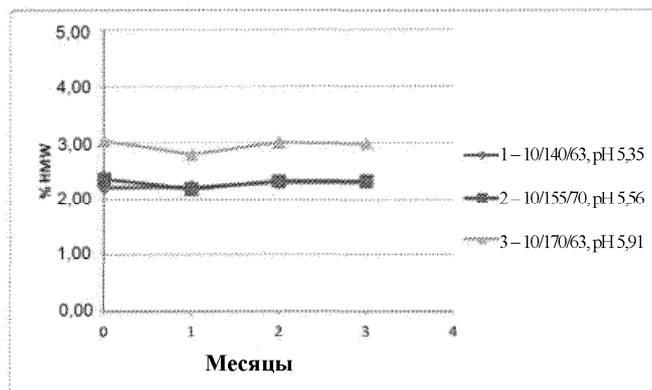
Фиг. 22



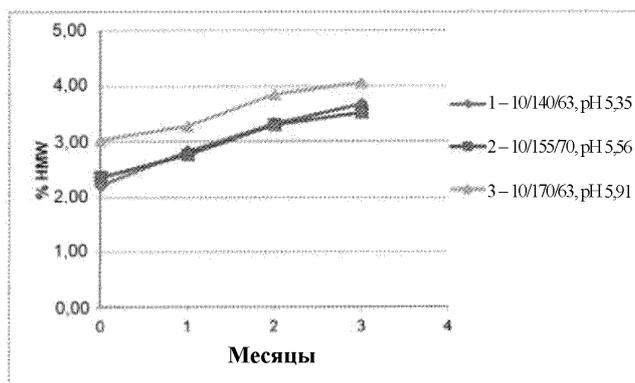
Фиг. 23



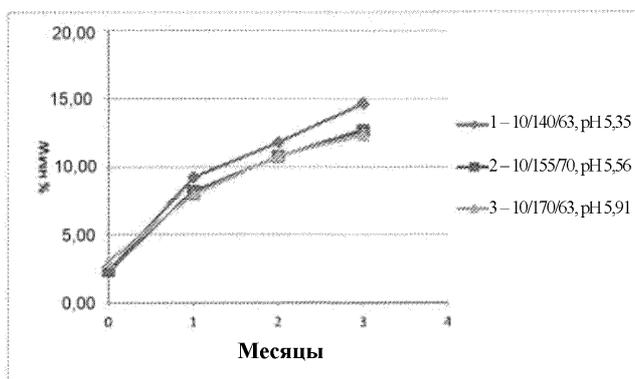
Фиг. 24



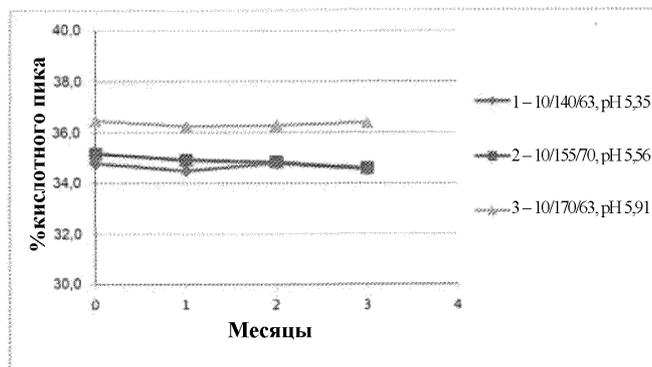
Фиг. 25А



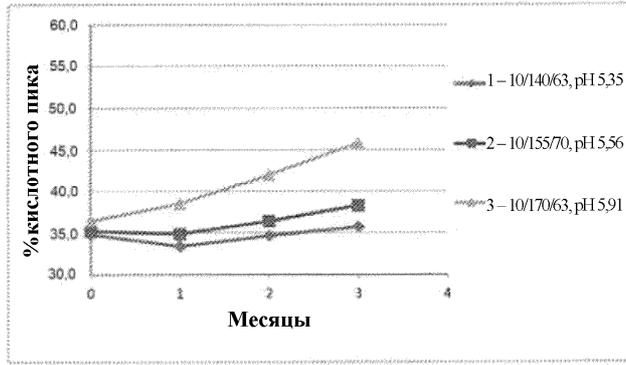
Фиг. 25В



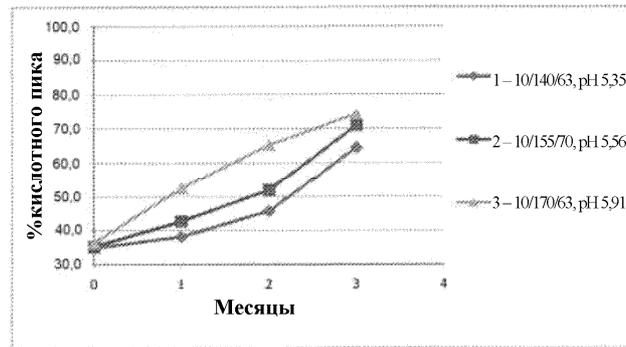
Фиг. 25С



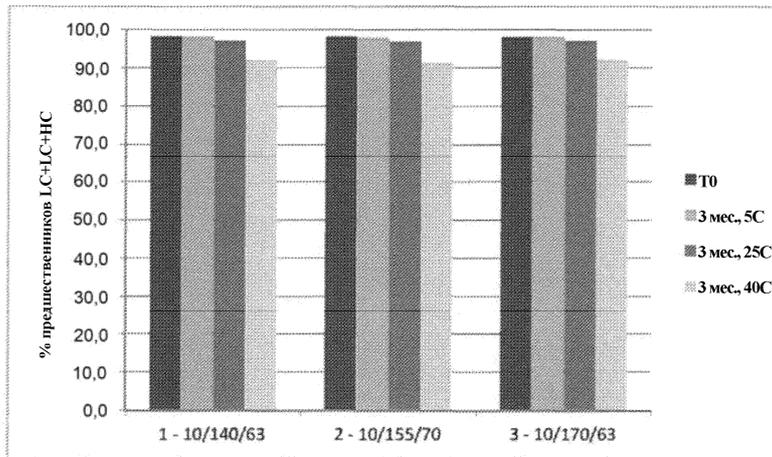
Фиг. 26А



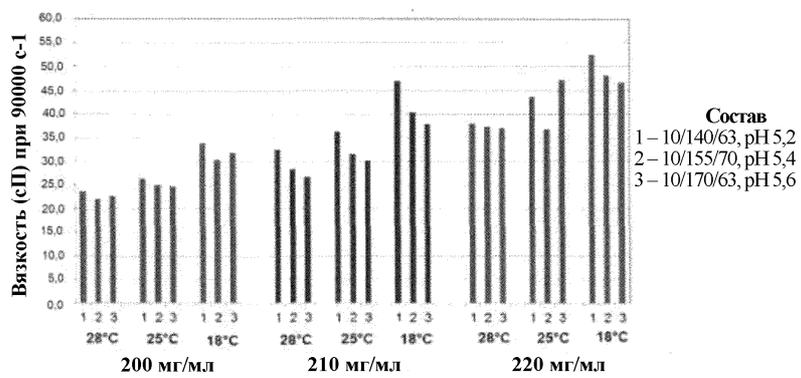
Фиг. 26В



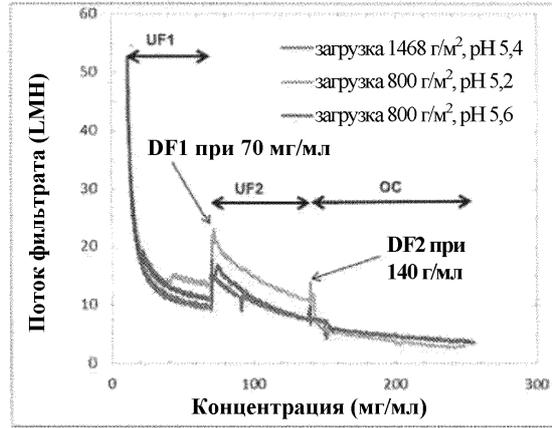
Фиг. 26С



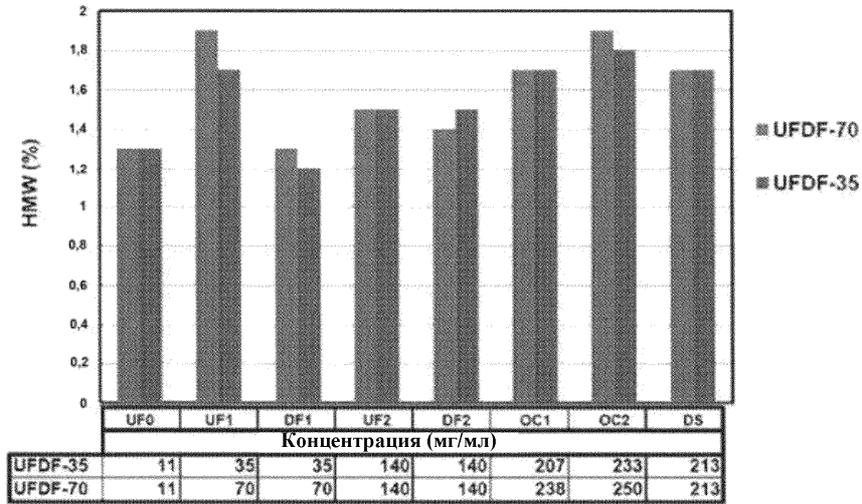
Фиг. 27



Фиг. 28

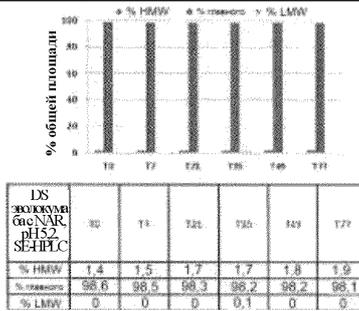


Фиг. 29



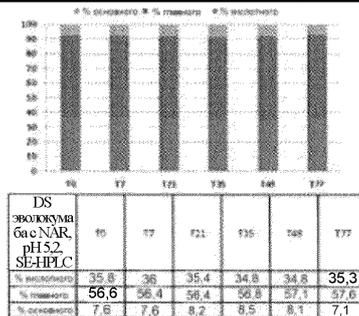
Фиг. 30

**DS эволюкумаба с NAR, pH 5,2, SE-HPLC**



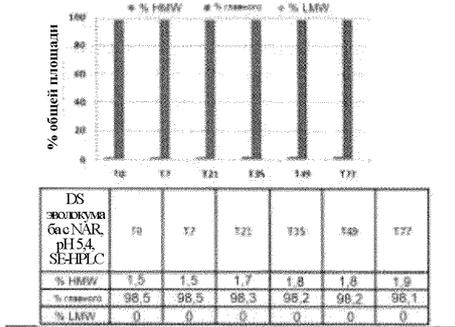
Фиг. 31А

**DS эволюкумаба с NAR, pH 5,2, SE-HPLC**



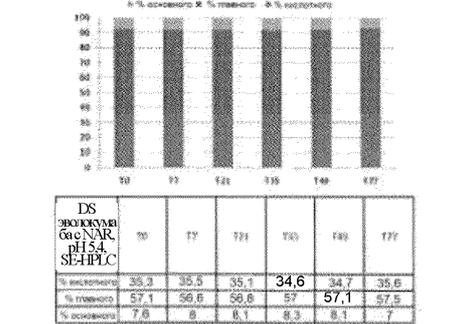
Фиг. 31В

**DS эволюкумаба с NAR, pH 5,4, SE-HPLC**



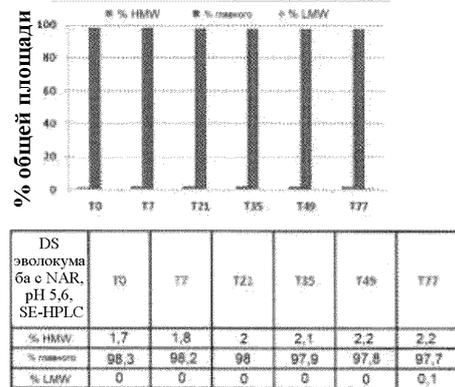
Фиг. 31C

**DS эволюкумаба с NAR, pH 5,4, CE-HPLC**



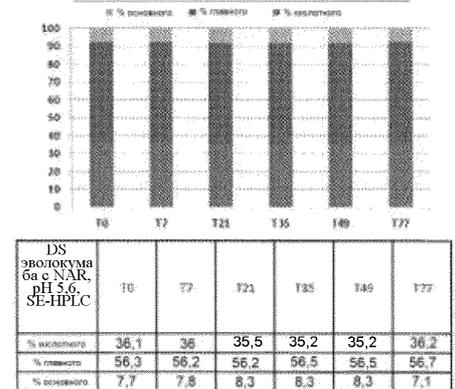
Фиг. 31D

**DS эволюкумаба с NAR, pH 5,6, SE-HPLC**

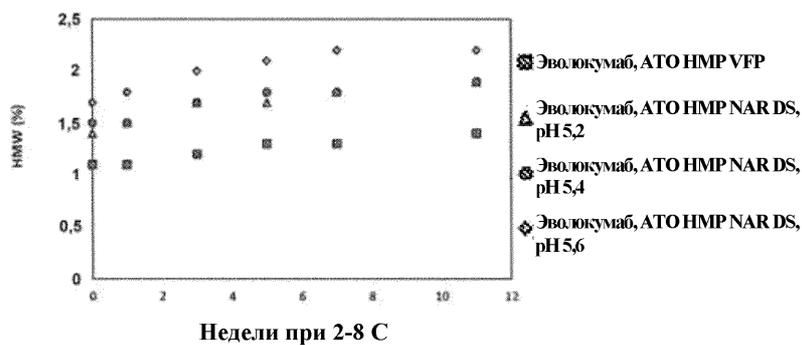


Фиг. 31E

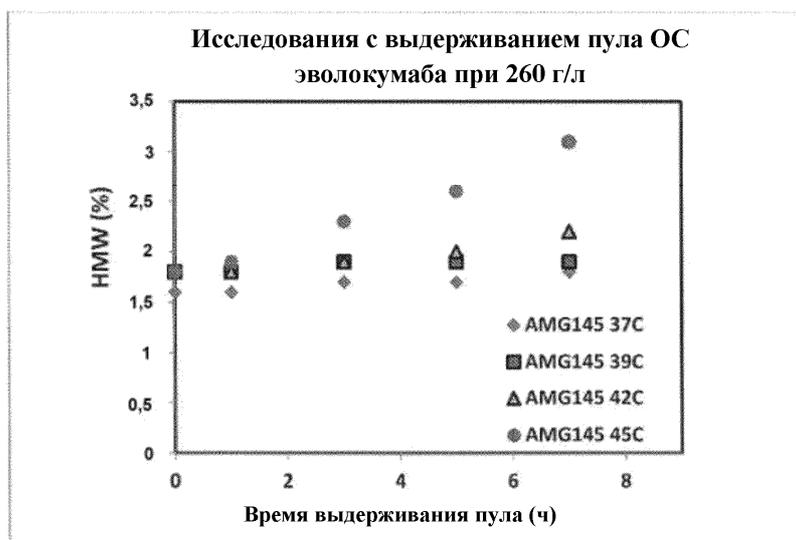
**DS эволюкумаба с NAR, pH 5,6, CE-HPLC**



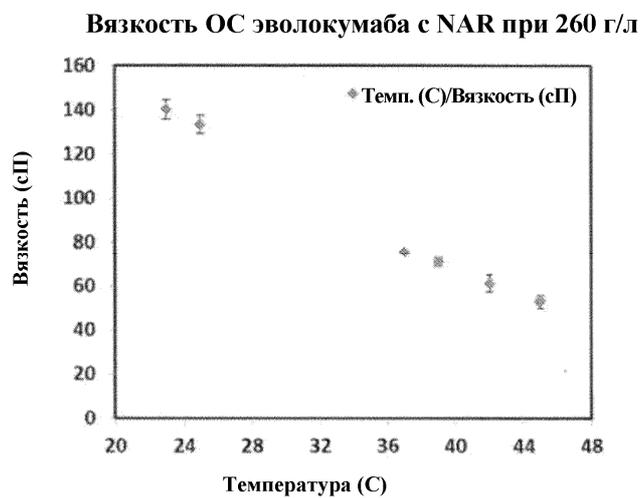
Фиг. 31F



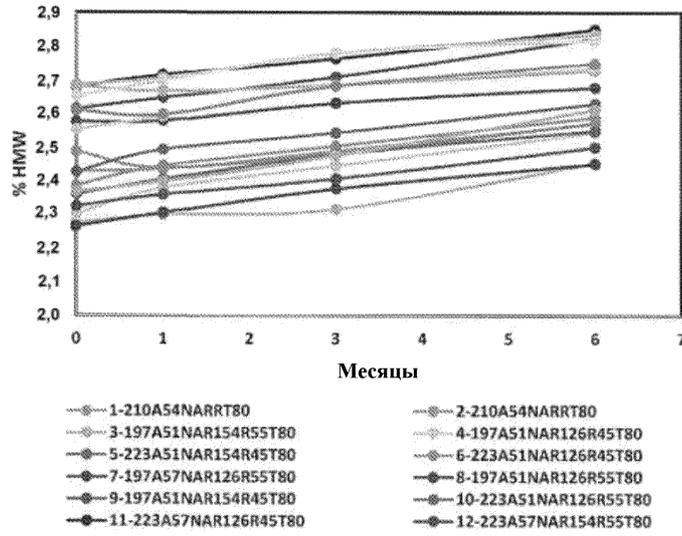
Фиг. 32



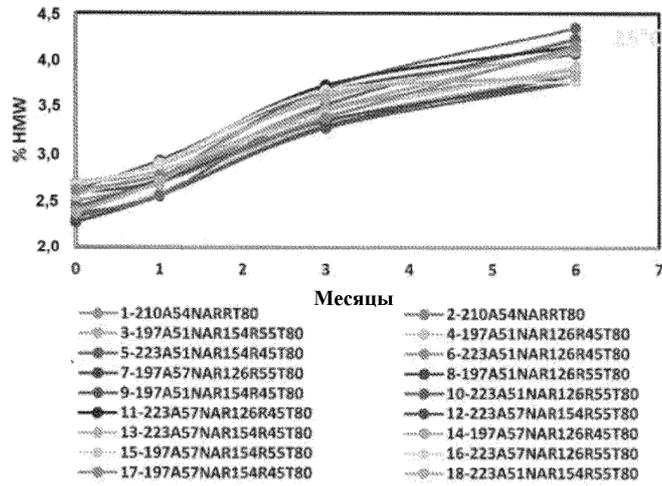
Фиг. 33



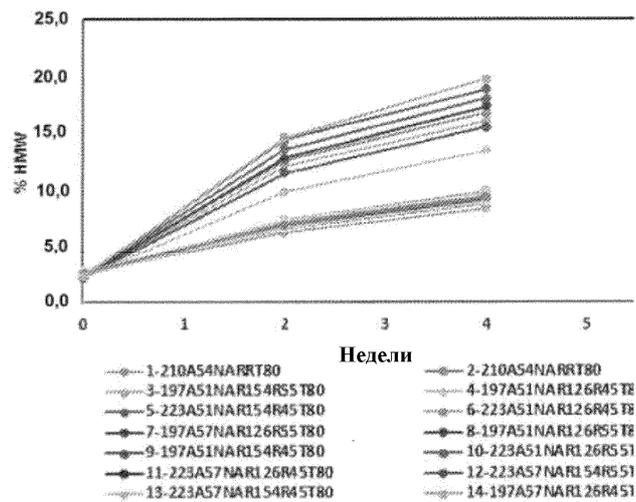
Фиг. 34



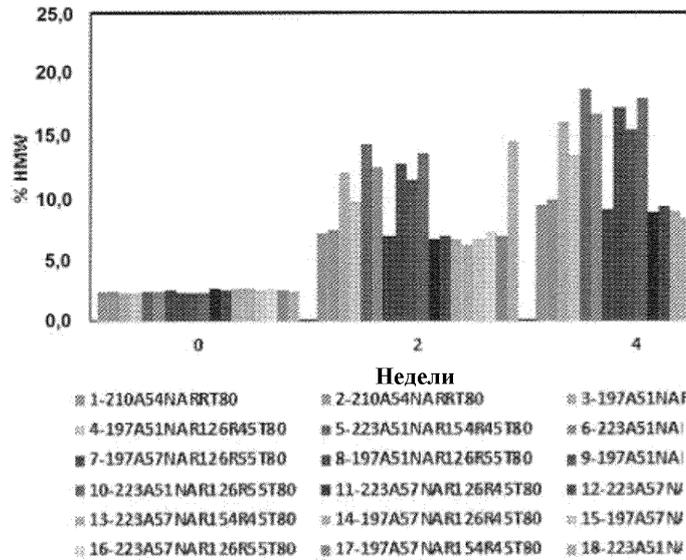
Фиг. 35А



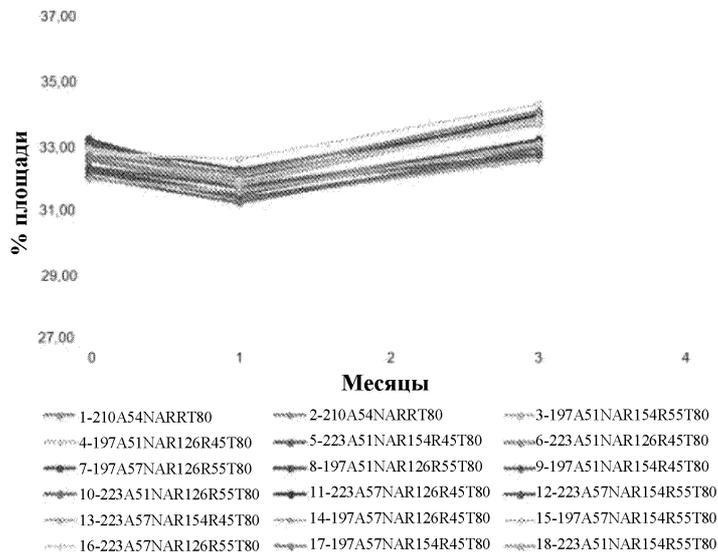
Фиг. 35В



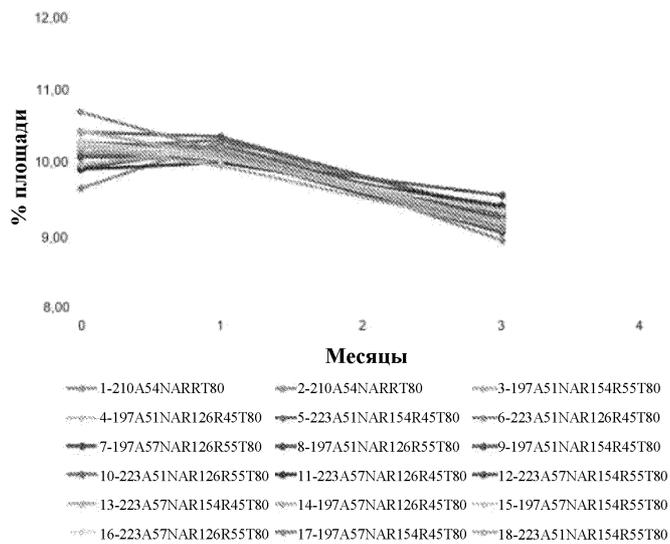
Фиг. 35С



Фиг. 35D

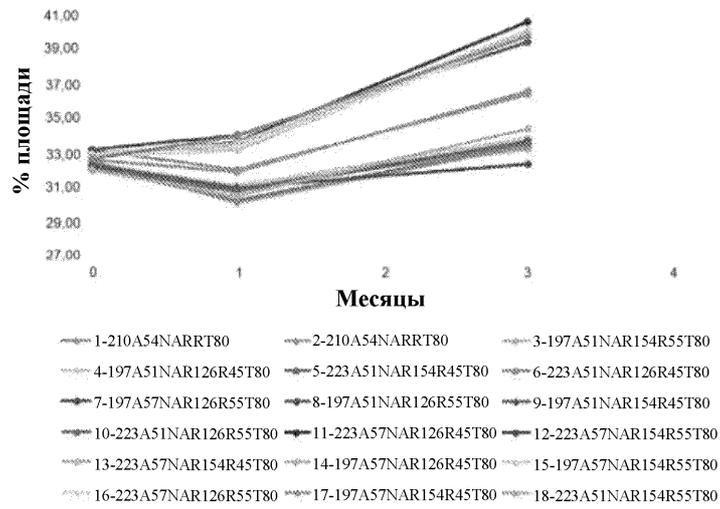


Фиг. 36А

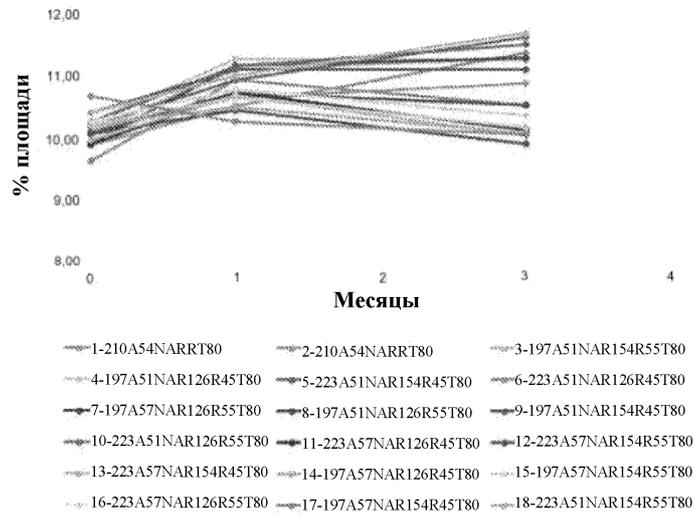


Фиг. 36В

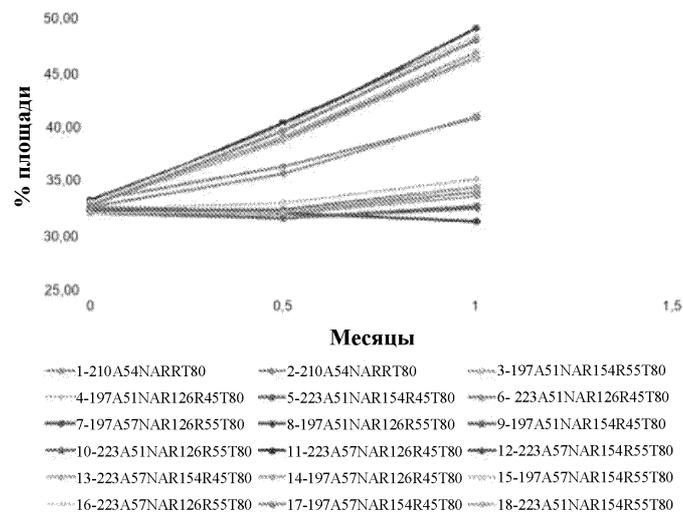
045816



Фиг. 36С

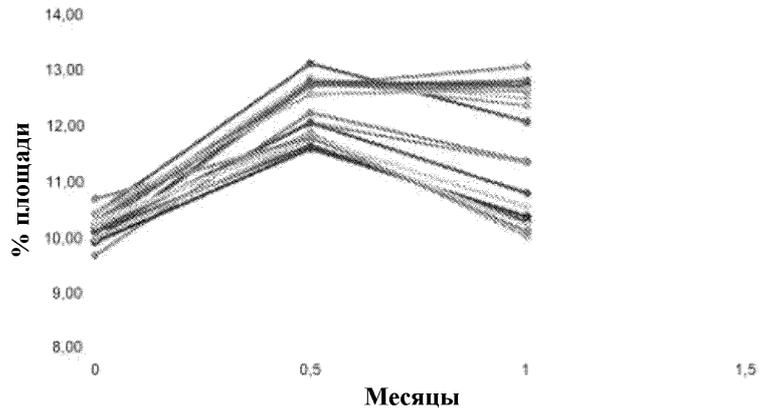


Фиг. 36D



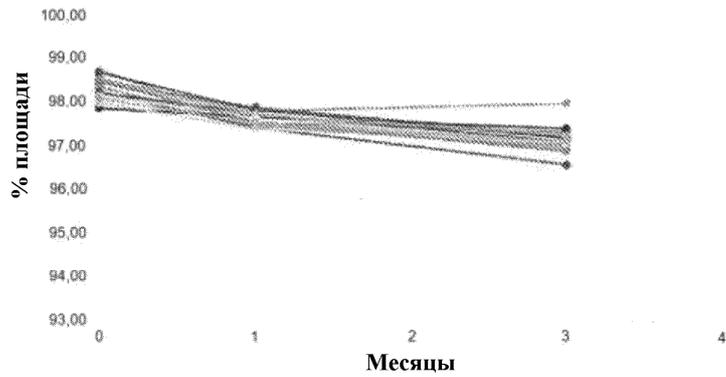
Фиг. 36Е

045816



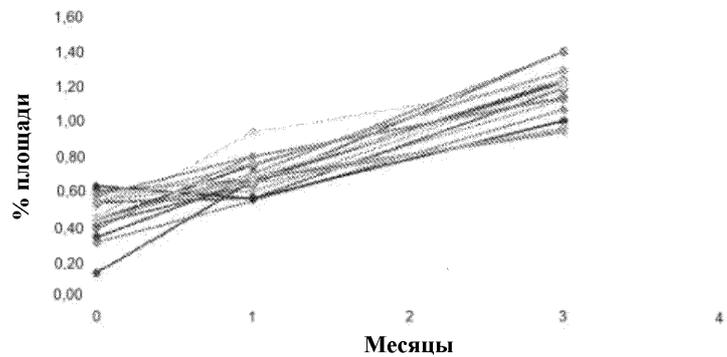
- 1-210A54NARRT80
- 2-210A54NARRT80
- 3-197A51NAR154R55T80
- 4-197A51NAR126R45T80
- 5-223A51NAR154R45T80
- 6-223A51NAR126R45T80
- 7-197A57NAR126R55T80
- 8-197A51NAR126R55T80
- 9-197A51NAR154R45T80
- 10-223A51NAR126R55T80
- 11-223A57NAR126R45T80
- 12-223A57NAR154R55T80
- 13-223A57NAR154R45T80
- 14-197A57NAR126R45T80
- 15-197A57NAR154R55T80
- 16-223A57NAR126R55T80
- 17-197A57NAR154R45T80
- 18-223A51NAR154R55T80

Фиг. 36F



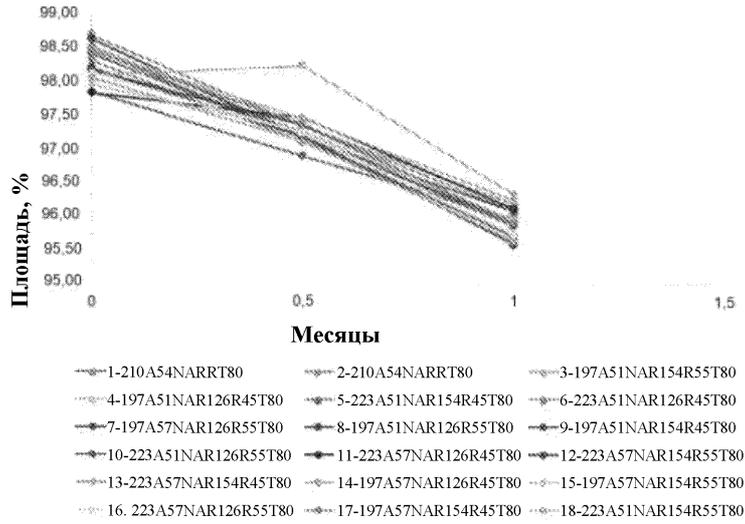
- 1-210A54NARRT80
- 2-210A54NARRT80
- 3-197A51NAR154R55T80
- 4-197A51NAR126R45T80
- 5-223A51NAR154R45T80
- 6-223A51NAR126R45T80
- 7-197A57NAR126R55T80
- 8-197A51NAR126R55T80
- 9-197A51NAR154R45T80
- 10-223A51NAR126R55T80
- 11-223A57NAR126R45T80
- 12-223A57NAR154R55T80
- 13-223A57NAR154R45T80
- 14-197A57NAR126R45T80
- 15-197A57NAR154R55T80
- 16-223A57NAR126R55T80
- 17-197A57NAR154R45T80
- 18-223A51NAR154R55T80

Фиг. 37A

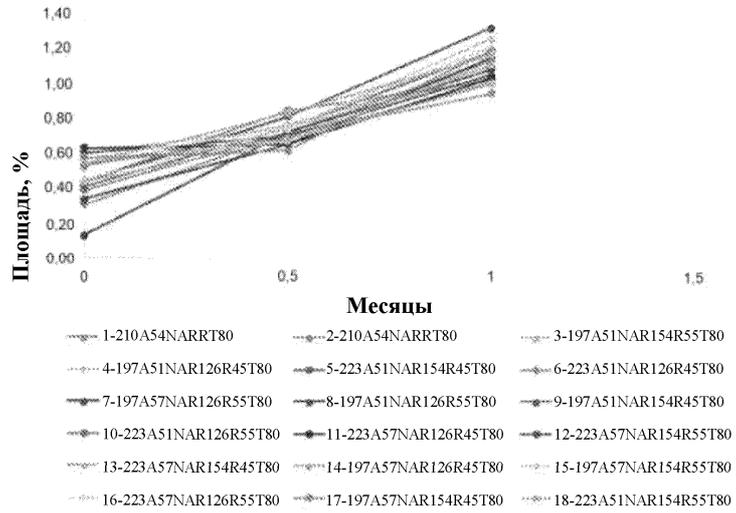


- 1-210A54NARRT80
- 2-210A54NARRT80
- 3-197A51NAR154R55T80
- 4-197A51NAR126R45T80
- 5-223A51NAR154R45T80
- 6-223A51NAR126R45T80
- 7-197A57NAR126R55T80
- 8-197A51NAR126R55T80
- 9-197A51NAR154R45T80
- 10-223A51NAR126R55T80
- 11-223A57NAR126R45T80
- 12-223A57NAR154R55T80
- 13-223A57NAR154R45T80
- 14-197A57NAR126R45T80
- 15-197A57NAR154R55T80
- 16-223A57NAR126R55T80
- 17-197A57NAR154R45T80
- 18-223A51NAR154R55T80

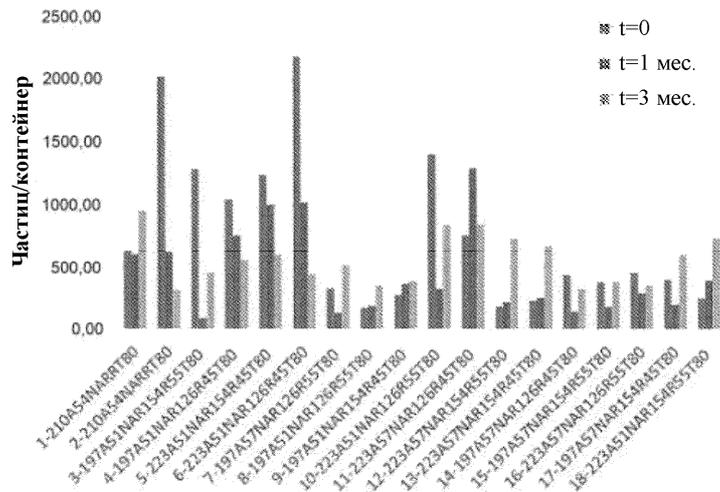
Фиг. 37B



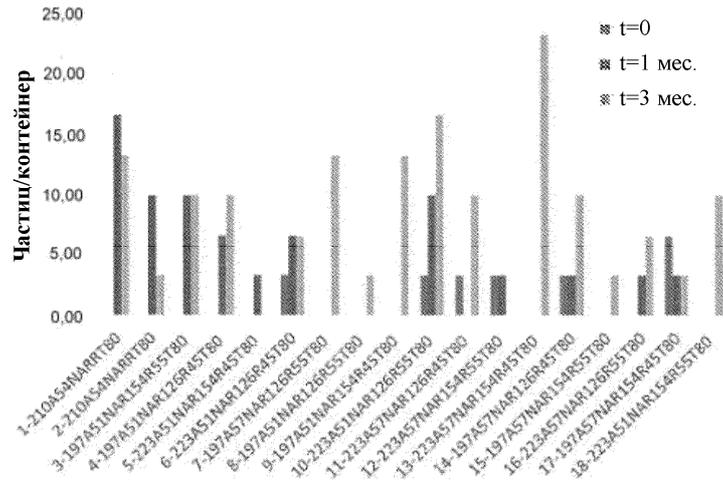
Фиг. 37С



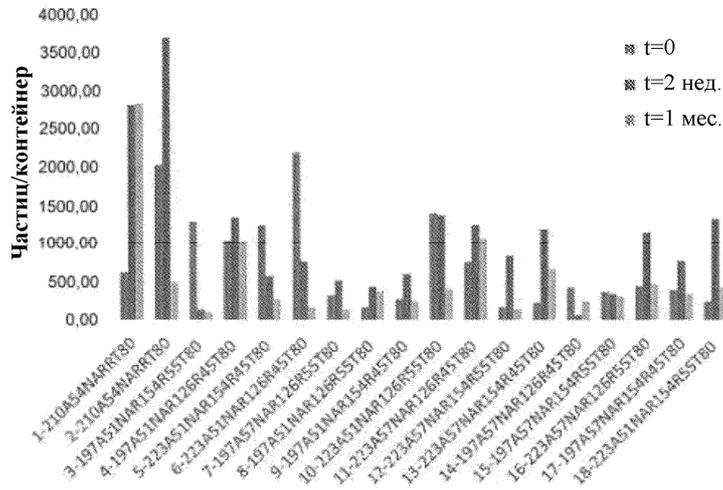
Фиг. 37D



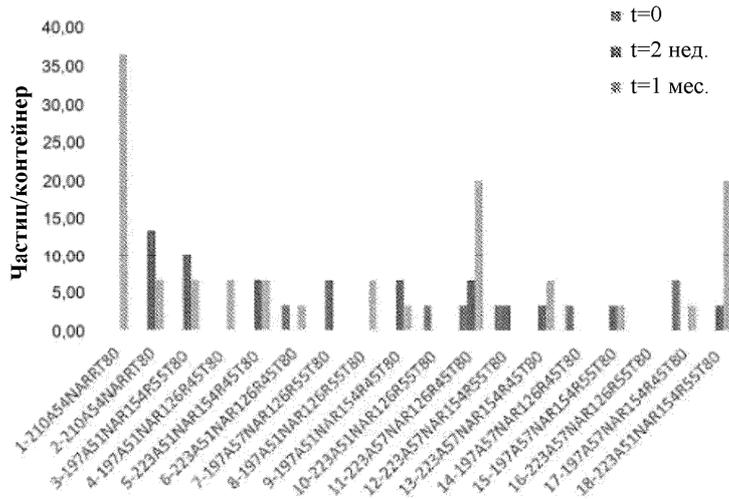
Фиг. 38А



Фиг. 38В



Фиг. 38С



Фиг. 38D

