

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391993** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.10.27

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.17

(54) **ВОДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ СКОНСТРУИРОВАННОЙ БЕЛКОВОЙ КОНСТРУКЦИИ,
СОДЕРЖАЩЕЙ ДОМЕН Fc**

(31) 63/150,510

(32) 2021.02.17

(33) US

(86) PCT/GB2022/050424

(87) WO 2022/175663 2022.08.25

(71) Заявитель:
АРЕКОР ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Езек Ян, Герринг Дэвид (GB)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Представлена, среди прочего, композиция в виде водного раствора, имеющая рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащая сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc; необязательно один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем рK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом рK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции; необязательно одну или более нейтральных аминокислот; и незаряженный модификатор тоничности; при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ.

A1

202391993

202391993

A1

Водная композиция сконструированной белковой конструкции, содержащей домен Fc

Данное изобретение относится к водным растворам – композициям сконструированных белковых конструкций, которые содержат домен Fc, с низкими концентрациями буферов и низкой ионной силой.

Уровень техники

Сконструированные белковые конструкции, содержащие домен Fc, широко применяются в терапии. Домен Fc представляет собой C-концевую область антитела, которая взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности, называемыми рецепторами Fc, и некоторыми белками системы комплемента, и тем самым активирует иммунную систему. В изотипах антител IgG, IgA и IgD домен Fc состоит из двух одинаковых фрагментов белковой цепи, каждый из которых происходит из второго и третьего константных доменов тяжелой цепи антитела. В изотипах антител IgM и IgE домен Fc состоит из двух одинаковых фрагментов белковой цепи, каждый из которых происходит из второго, третьего и четвертого константных доменов тяжелой цепи антитела. Молекулярная масса домена Fc, как правило, может находиться в диапазоне 25-40 кДа и может быть более высокой, если присутствует гликозилирование. В результате активации иммунной системы, опосредованной связыванием домена Fc антител, возникает широкий спектр физиологических эффектов, включительно с лизисом клеток и дегрануляцией тучных клеток, базофилов и эозинофилов.

Был разработан широкий спектр сконструированных белковых конструкций антител, включающий в себя биспецифические и триспецифические антитела. Также был разработан ряд сконструированных белковых конструкций, в которых Fc, отделенный от Fab-частей молекулы антитела (частей, которые придают специфичность связывания с антигеном), может служить цели, отличной от его физиологического назначения, в частности, цели продления периода полужизни белковой конструкции *in vivo*.

При приготовлении в виде водных растворов белки нестабильны и подвержены деградации и последующей потере биологической активности при хранении. Деградация может носить физический характер, что включает в себя агрегацию, осаждение или гелеобразование. Деградация также может быть химической по своей природе, включая в

себя гидролитическое расщепление, дезамидирование, образование циклических имидов, изомеризацию аспартата/глутамата или окисление.

Скорость процессов деградации увеличивается с повышением температуры, и белковые терапевтические молекулы, как правило, более стабильны при более низких температурах. Однако часто бывает непросто разработать терапевтический белковый продукт, который был бы стабилен в жидкой форме в течение всего предполагаемого срока годности (как правило, 24 месяца), даже при охлаждении. В дополнение к этому, для обеспечения удобства пациентов часто возникает необходимость в разработке продуктов, стабильных при повышенных температурах, например, до 25°C или до 30°C, либо в течение определенного периода времени, либо в течение всего срока их годности.

Одним из наиболее важных параметров для контроля стабильности белковых терапевтических средств является pH. Следовательно, оптимизация pH является ключевым шагом в разработке лекарственного состава. Многие терапевтические белки готовят в виде лекарственного состава при выбранном значении pH в диапазоне от 4,0 до 8,5. Считается важным обеспечить поддержание pH на выбранном уровне и свести колебания pH к минимуму. Следовательно, стало понятным, что лекарственный состав должен обладать определенной степенью буферной емкости. Более крупные белковые молекулы, как правило, обладают некоторой способностью самобуферизации вследствие присутствия ионизируемых групп среди аминокислотных боковых цепей полипептидной основы.

Данное изобретение решает проблему нестабильности сконструированных белковых конструкций, которые содержат домен Fc, в композициях водных растворов.

В WO2006/138181A2 (Amgen) раскрыты самобуферизующиеся белковые композиции, которые по существу не содержат других буферных агентов.

В WO2009/073569 (Abbott) раскрыты водные лекарственные составы антител, таких как адалимумаб, которые обладают электропроводностью меньше чем около 2,5 мСм/см.

В WO2008/084237 (Arecor) раскрыты белковые композиции, которые не содержат обычные буферы в значимом количестве. Вместо этого используются «вытесненные буферы», которые представляют собой добавки со значениями pK_a, которые по меньшей мере на 1 единицу меньше или на 1 единицу больше, чем pH композиции.

В WO2018/094316 (Just Biotherapeutics) раскрыты офтальмологические лекарственные составы, содержащие афлиберцепт.

В WO2013/059412 и WO2014/011629 (Coherus) раскрыты водные лекарственные составы этанерцепта.

Краткое описание сущности изобретения

Согласно данному изобретению в данном документе представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем pK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом pK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции;
- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и
- незаряженный модификатор тоничности;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ.

Подробное описание сущности изобретения

В данном документе описаны стабильные водные растворы – композиции сконструированных белковых конструкций, содержащих домен Fc, характеризующиеся отсутствием или низкой концентрацией буфера и низкой ионной силой.

Следует отметить, что в данном документе все ссылки на «рН» относятся к показателю рН композиции, определенному при 25°C. Все ссылки на « pK_a » относятся к показателю pK_a ионизируемой группы, определенному при 25 °C (см. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 79th Edition, 1998, D. R. Lide). При необходимости значения pK_a боковых цепей аминокислот в том виде, в каком они существуют в полипептиде, можно определить с помощью подходящей расчетной программы.

Авторы данного изобретения полагают, что буферы оказывают пагубное влияние на стабильность сконструированных белковых конструкций, содержащих домен Fc. Следовательно, концентрация буфера в композиции должна быть максимально ограничена. В определенных вариантах осуществления требуется минимальное количество буфера для поддержания стабильности композиции и сведения к минимуму колебаний pH.

Буфер (-ы), когда он (-и) присутствует (-ют), будет (-ут) обладать буферной емкостью при данном pH композиции. Как правило, буферы содержат ионизируемые группы с pK_a в диапазоне 1 единицы pH от pH композиции, однако фрагмент, который содержит ионизируемые группы, pK_a которых является на 1 единицу pH большим или меньшим, чем pH композиции, может также обеспечивать некоторый буферный эффект, если присутствует в достаточном количестве. В одном варианте осуществления буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в диапазоне 1 единицы pH от pH композиции. В другом варианте осуществления буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в диапазоне 1,5 единиц pH от pH композиции (например, в диапазоне от 1 до 1,5 единиц pH от pH композиции). В дополнительном варианте осуществления буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в диапазоне 2 единиц pH от pH композиции (например, в диапазоне от 1,5 до 2 единиц pH от pH композиции).

В варианте осуществления композиция по существу не содержит буферов, например, не содержит никаких буферов. В варианте осуществления композиция содержит один буфер. В варианте осуществления композиция содержит два буфера. Подходящим образом присутствуют один или более буферов.

В одном варианте осуществления общая концентрация буферов в композиции составляет меньше чем 4,5 мМ, например, меньше чем 4 мМ, меньше чем 3 мМ, меньше чем 2 мМ, меньше чем 1 мМ, меньше чем 0,5 мМ, меньше чем 0,4 мМ, меньше чем 0,3 мМ или меньше чем 0,2 мМ, или меньше чем 0,1 мМ. В одном варианте осуществления общая концентрация буферов составляет от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 0,5 мМ до около 5 мМ, от около 0,1 мМ до около 4 мМ, от около 0,5 мМ до около 4 мМ, от около 0,1 мМ до около 3 мМ, от около 0,5 мМ до около 3 мМ, от около 0,1 мМ до около 2 мМ, от около 0,5 мМ до около 2 мМ, от около 0,1 мМ до около 1 мМ или от около 0,5 мМ до около 1 мМ. В одном варианте осуществления общая концентрация буферов составляет от около 1 мМ до около 5 мМ, от около 1 мМ до около 4 мМ или от около 1 мМ до около 3 мМ. В одном варианте осуществления общая концентрация буферов в композиции

составляет <4,5 мМ, например, <4 мМ, <3 мМ, <2 мМ, <1 мМ, <0,5 мМ, <0,4 мМ, <0,3 мМ, <0,2 мМ или <0,1 мМ. В одном варианте осуществления водный раствор-композиция по существу не содержит буфер. При употреблении в контексте данного документа термин «по существу не содержит» означает, что водный раствор-композиция содержит меньше чем 0,1 мМ буфера. При рассмотрении концентрации буфера в растворе следует исключить любую буферную способность самой сконструированной белковой конструкции.

В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 4 мМ, от около 1 мМ до около 3 мМ или от около 1 мМ до около 2 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в композиции в общей концентрации, которая составляет от около 1,5 мМ до около 5 мМ, например, от около 1,5 мМ до около 4 мМ, от около 1,5 мМ до около 3 мМ или от около 1,5 мМ до около 2 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в композиции в общей концентрации, которая составляет от около 2 мМ до около 4 мМ или от около 2 мМ до около 3 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в композиции в общей концентрации, которая составляет от около 3,5 мМ до около 4 мМ.

В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 10 мМ, от около 6 мМ до около 10 мМ, от около 6,5 мМ до около 10 мМ, от около 7 мМ до около 10 мМ, от около 7,5 мМ до около 10 мМ, от около 8 мМ до около 10 мМ, от около 8,5 мМ до около 10 мМ или от около 9 мМ до около 10 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 5 мМ до около 9,5 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 9,5 мМ, от около 6 мМ до около 9,5 мМ, от около 6,5 мМ до около 9,5 мМ, от около 7 мМ до около 9,5 мМ, от около 7,5 мМ до около 9,5 мМ, от около 8 мМ до около 9,5 мМ или от около 8,5 мМ до около 9,5 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 5 мМ до около 9 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 9 мМ, от около 6 мМ до около 9 мМ, от около 6,5 мМ до около 9 мМ, от около 7 мМ до около 9 мМ, от около 7,5 мМ до около 9 мМ или от около 8 мМ до около 9 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 5 мМ до около 8,5 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 8,5 мМ, от около 6 мМ до около 8,5 мМ, от около 6,5 мМ до около 8,5 мМ, от около 7 мМ до около 8,5 мМ или от около 7,5 мМ до около 8,5 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 5 мМ до около 8 мМ, например, от около 5,5

7,5 мМ, от около 4,5 мМ до около 7,5 мМ, от около 5 мМ до около 7,5 мМ, от около 5,5 мМ до около 7,5 мМ или от около 6 мМ до около 7,5 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 3 мМ до около 7 мМ, от около 3,5 мМ до около 7 мМ, от около 4 мМ до около 7 мМ, от около 4,5 мМ до около 7 мМ, от около 5 мМ до около 7 мМ, от около 5,5 мМ до около 7 мМ или от около 6 мМ до около 7 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 3 мМ до около 6,5 мМ, от около 3,5 мМ до около 6,5 мМ, от около 4 мМ до около 6,5 мМ, от около 4,5 мМ до около 6,5 мМ, от около 5 мМ до около 6,5 мМ или от около 5,5 мМ до около 6,5 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 3 мМ до около 6 мМ, от около 3,5 мМ до около 6 мМ, от около 4 мМ до около 6 мМ, от около 4,5 мМ до около 6 мМ или от около 5 мМ до около 6 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 3 мМ до около 5,5 мМ, от около 3,5 мМ до около 5,5 мМ, от около 4 мМ до около 5,5 мМ или от около 4,5 мМ до около 5,5 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 3 мМ до около 5 мМ, от около 3,5 мМ до около 5 мМ или от около 4 мМ до около 5 мМ. В одном варианте осуществления буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет от около 3 мМ до около 4,5 мМ или от около 3,5 мМ до около 4,5 мМ.

pH водного раствора снижается при добавлении кислоты и увеличивается при добавлении основания. При заданных температуре и атмосферном давлении величина снижения pH при добавлении кислоты или величина увеличения pH при добавлении основания зависит от: (1) количества добавленной кислоты или основания, (2) исходного значения pH водного раствора (т. е. до добавления кислоты или основания) и (3) присутствия буфера. Следовательно, (1) начиная с заданного значения pH, добавление большего количества кислоты или основания приведет к большей величине изменения pH, (2) добавление заданного количества кислоты или основания приведет к наибольшему изменению pH при нейтральном значении pH (т. е. pH 7,0) и величина изменения pH будет уменьшаться по мере удаления исходного значения pH от pH 7,0, и (3) величина изменения pH, начиная с заданного значения pH, будет меньшей в присутствии буфера, чем в отсутствие буфера. Следовательно, буфер обладает способностью уменьшать изменение pH при добавлении в раствор кислоты или основания.

Соответствующим образом, вещество считается буфером, если оно способно снизить величину изменения рН раствора до 75%, предпочтительно – до 50%, наиболее предпочтительно – до 25%, по сравнению с идентичным раствором, который не содержит буфер, при добавлении либо сильной кислоты, либо сильного основания, которое приводит к увеличению содержания кислоты или основания в растворе на 0,1 мМ.

И наоборот, подходящим образом вещество не считается буфером, если оно не способно снизить величину изменения рН раствора до 75%, предпочтительно – до 50%, наиболее предпочтительно – до 25%, по сравнению с идентичным раствором, который не содержит данное вещество, при добавлении либо сильной кислоты, либо сильного основания, которое приводит к увеличению содержания кислоты или основания в растворе на 0,1 мМ.

В одном варианте осуществления буфер представляет собой аминокислоту. В одном варианте осуществления буфер представляет собой не аминокислоту. В одном варианте осуществления композиция не содержит аминокислоты лизин, аргинин, гистидин, глутамин и аспарат. В одном варианте осуществления композиция не содержит цистеин.

Если они присутствуют, подходящие буферы включают в себя, но не ограничиваются ими: цитрат, гистидин, малеат, сульфит, глиоксилат, аспартам, глюкуронат, аспарат, глутамат, тартрат, глюконат, лактат, гликолевую кислоту, аденин, сукцинат, аскорбат, бензоат, фенилацетат, галлат, цитозин, *p*-аминобензойную кислоту, сорбат, ацетат, пропионат, альгинат, урат, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту, бикарбонат, бис(2-гидроксиэтил) иминотрис(гидроксиметил)метан, *N*-(2-ацетиламино)-2-иминодиуксусную кислоту, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновую кислоту, пиперазин, *N,N'*-бис(2-этансульфоновую кислоту), фосфат, *N,N'*-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновую кислоту, 3-[*N,N'*-бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновую кислоту, триэтанолламин, пиперазин-*N,N'*-бис(2-гидроксипропансульфоновую кислоту), трис(гидроксиметил)аминометан, *N*-трис(гидроксиметил)глицин и *N*-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновую кислоту, и их соли, и их комбинации. В одном варианте осуществления буфер выбран из гистидина, малеата, сульфита, глиоксилата, аспартама, глюкуроната, аспартата, глутамата, тартрата, глюконата, лактата, гликолевой кислоты, аденина, сукцината, аскорбата, бензоата, фенилацетата, галлата, цитозина, *p*-аминобензойной кислоты, сорбата, ацетата, пропионата, альгината, урата, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновой кислоты, бикарбоната,

бис(2-гидроксиэтил) иминоtris(гидроксиметил)метана, *N*-(2-ацетамидо)-2-иминодиуксусной кислоты, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновой кислоты, пиперазина, *N,N'*-бис(2-этансульфоновой кислоты), фосфата, *N,N'*-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты, 3-[*N,N'*-бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновой кислоты, триэаноламина, пиперазин-*N,N'*-бис(2-гидроксипропансульфоновой кислоты), трис(гидроксиметил)аминометана, *N*-трис(гидроксиметил)глицина и *N*-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновой кислоты, и их солей, и их комбинаций. В одном варианте осуществления буфер выбран из цитрата, малеата, сульфита, глиоксилата, аспартама, глюкуроната, тартрата, глюконата, лактата, гликолевой кислоты, аденина, сукцината, аскорбата, бензоата, фенилацетата, галлата, цитозина, *p*-аминобензойной кислоты, сорбата, ацетата, пропионата, альгината, урата, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновой кислоты, бикарбоната, бис(2-гидроксиэтил)иминоtris(гидроксиметил)метана, *N*-(2-ацетамидо)-2-иминодиуксусной кислоты, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновой кислоты, пиперазина, *N,N'*-бис(2-этансульфоновой кислоты), фосфата, *N,N'*-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты, 3-[*N,N'*-бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновой кислоты, триэаноламина, пиперазин-*N,N'*-бис(2-гидроксипропансульфоновой кислоты), трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS), *N*-трис(гидроксиметил)глицина и *N*-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновой кислоты, и их солей, и их комбинаций. В одном варианте осуществления буфер выбран из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, тартрата, лактата, бензоата, ацетата, бикарбоната, фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS), например, выбран из группы, состоящей из гистидина, малеата, тартрата, лактата, бензоата, ацетата, бикарбоната, фосфата и трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS), в частности – из гистидина, лактата, ацетата, фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS). Например, буфер представляет собой фосфат. В качестве альтернативы, буфер представляет собой трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS). В качестве альтернативы, буфер представляет собой гистидин. В качестве альтернативы, буфер представляет собой лактат. В качестве альтернативы, буфер представляет собой ацетат. В качестве альтернативы, буфер представляет собой цитрат.

В варианте осуществления композиция не содержит натрий фосфат. В варианте осуществления композиция содержит фосфатный буфер (например, натрий фосфат), подходящая концентрация которого составляет меньше чем 4,5 мМ, например, меньше чем 4,0 мМ.

Главным растворителем для композиций согласно данному изобретению является вода, например, вода для инъекций. Другие компоненты композиций (например, полиол) могут способствовать растворению сконструированной белковой конструкции.

Композиция содержит незаряженный модификатор тоничности, такой как полиол. Примеры незаряженных модификаторов тоничности включают в себя глицерол, 1,2-пропандиол, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу, ПЭГ300 и ПЭГ400. Подходящим образом незаряженный модификатор тоничности выбран из глицерола, маннита, 1,2-пропандиола и сахарозы. Общая концентрация незаряженного модификатора тоничности, если таковой включен в состав, подходящим образом составляет 50-1000 мМ, например, 200-500 мМ, например, около 300 мМ.

Композиция подходящим образом имеет осмолярность, которая является физиологически приемлемой и, следовательно, пригодной для парентерального введения. Следовательно, подходящим образом осмолярность композиции составляет от около 200 мОсм/л до около 600 мОсм/л, например, от около 200 мОсм/л до около 500 мОсм/л, от около 200 мОсм/л до около 400 мОсм/л или от около 300 мОсм/л.

В одном варианте осуществления осмолярность композиции составляет от около 200 мОсм/л до около 550 мОсм/л, например, от около 200 мОсм/л до около 500 мОсм/л, от около 200 мОсм/л до около 450 мОсм/л, от около 200 мОсм/л до около 400 мОсм/л, от около 200 мОсм/л до около 350 мОсм/л или от около 200 мОсм/л до около 300 мОсм/л. В одном варианте осуществления осмолярность композиции составляет от около 250 мОсм/л до около 600 мОсм/л, например, от около 300 мОсм/л до около 600 мОсм/л, от около 350 мОсм/л до около 600 мОсм/л, от около 400 мОсм/л до около 600 мОсм/л, от около 450 мОсм/л до около 600 мОсм/л или от около 500 мОсм/л до около 600 мОсм/л. Композиция, например, является изотонической относительно плазмы крови человека. Композиции также могут быть гипотоническими или гипертоническими, например, те, которые предназначены для разведения перед введением. В одном варианте осуществления композиция является слабо гипертонической. В одном варианте осуществления осмолярность композиции составляет от около 300 мОсм/л до около 500 мОсм/л, например, от около 350 мОсм/л до около 500 мОсм/л, например, от около 400 мОсм/л до около 500 мОсм/л.

Композиция необязательно может содержать одну или более нейтральных аминокислот. При употреблении в контексте данного документа нейтральная аминокислота – это аминокислота, боковая цепь которой не содержит ионизируемую группу, которая значительно ионизирована (например, больше чем 20%, особенно больше чем 50% боковой цепи имеют отрицательный или положительный заряд) при рН композиции. Иллюстративные нейтральные аминокислоты представляют собой глицин, метионин, пролин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин, триптофан, серин, треонин, аспарагин и глютамин, и, в частности, их L-изомеры.

Подходящим образом нейтральные аминокислоты выбраны из глицина, метионина, пролина и аланина, в частности – выбраны из пролина и глицина, особенно из пролина.

Общая концентрация одной или большего числа нейтральных аминокислот, если они присутствуют, может, например, составлять 20-250 мМ, например, 20-200 мМ, например, 50-150 мМ, например, 50-100 мМ или 25-75 мМ. В качестве альтернативы, она может составлять 100-250 мМ, например, 150-200 мМ.

Авторы данного изобретения полагают, что присутствие ионов оказывает пагубное влияние на стабильность сконструированных белковых конструкций, содержащих домен Fc. Следовательно, ионная сила композиции должна быть максимально ограничена.

Общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ, подходящим образом – меньше чем 10 мМ, например, меньше чем 9 мМ, меньше чем 8 мМ, меньше чем 7 мМ, меньше чем 6 мМ, меньше чем 5 мМ. Термин «общая ионная сила» употребляется в контексте данного документа как следующая функция концентрации всех ионов в растворе:

$$I = \sum_{x=1}^n c_x z_x^2 / 2$$

где c_x – молярная концентрация иона x (моль L^{-1}), z_x – суммарный заряд иона c_x . Сумма охватывает все ионы (n), присутствующие в растворе, исключая вклад сконструированной белковой конструкции. Следует понимать, что необязательные нейтральные аминокислоты в композициях согласно данному изобретению имеют суммарный заряд, равный нулю, и, следовательно, не вносят вклад в общую ионную силу. В любом случае, вклад каких-либо нейтральных аминокислот не учитывается.

pH композиции составляет от около 4,0 до около 8,5, например, от около 4,0 до около 7,5 или от около 5,0 до около 8,5, например, от около 6,0 до около 8,5, например, от около 6,5 до около 8,5 или от около 6,0 до около 7,5, например, от около 7,0 до около 7,5. Другие представляющие интерес диапазоны включают в себя от около 5,0 до около 8,0, например, от около 5,0 до около 7,5, например, от около 5,5 до около 7,5, особенно – от около 6,0 до около 7,5.

В одном варианте осуществления pH композиции составляет от около 4,0 до около 8,5, например, от около 4,0 до около 8,0, от около 4,0 до около 7,5, от около 4,0 до около 7,0, от около 4,0 до около 6,5, от около 4,0 до около 6,0, от около 4,0 до около 5,5 или от около 4,0 до около 5,0. В одном варианте осуществления pH композиции составляет от около 4,5 до около 8,5, например, от около 4,5 до около 8,0, от около 4,5 до около 7,5, от около 4,5 до около 7,0, от около 4,5 до около 6,5, от около 4,5 до около 6,0 или от около 4,5 до около 5,5. В одном варианте осуществления pH композиции составляет от около 5,0 до около 8,5, например, от около 5,0 до около 8,0, от около 5,0 до около 7,5, от около 5,0 до около 7,0, от около 5,0 до около 6,5 или от около 5,0 до около 6,0. В одном варианте осуществления pH композиции составляет от около 5,5 до около 8,5, например, от около 5,5 до около 8,0, от около 5,5 до около 7,5, от около 5,5 до около 7,0 или от около 5,5 до около 6,5. В одном варианте осуществления pH композиции составляет от около 6,0 до около 8,5, например, от около 6,0 до около 7,5 или от около 6,0 до около 7,0.

Композиции согласно данному изобретению содержат сконструированную белковую конструкцию. Сконструированные белковые конструкции представляют собой не встречающиеся в природе белки, как правило получаемые в результате генной инженерии (слияния генов) или синтетической химии. Сконструированные белковые конструкции сочетают потенциально полезные свойства, которые первоначально присутствовали в двух или большем числе отдельных белков (и/или отдельных генов, кодирующих отдельные белки), в одной интактной белковой конструкции. Например, домен Fc может быть связан (т. е. слит) с белком со специфической желаемой биологической функцией (например, с агонистом GLP-1), защищая его от ферментативной деградации и тем самым увеличивая период полужизни в циркуляции. В качестве альтернативы, два или более антигенсвязывающих доменов иммуноглобулина могут быть связаны (т. е. слиты) с доменом Fc либо напрямую, либо через дополнительные домены, для создания сконструированного антитела с множественной валентностью и/или специфичностью. В то время как такие искусственные манипуляции со структурой белка с

использованием принципов геной инженерии или синтетической химии часто приводят к созданию искусственных конструкций с весьма желательными физиологическими свойствами для лечения заболеваний, это часто приводит к неестественной экспозиции структурных мотивов на поверхности нового генерируемого белка, таких как обширные гидрофобные участки или другие точки нестабильности, которые обычно не подвергаются экспозиции. Это в свою очередь приводит к нарушению стабильности сконструированных белковых конструкций, например, к повышенной склонности к агрегации. Данное изобретение устраняет такую повышенную нестабильность сконструированных белковых конструкций.

Полностью человеческие моноспецифические антитела (и природные антитела других видов, отличных от человека), даже если они продуцируются путем экспрессии в гетерологичном хозяине, таком как бактерия или гриб, не охватываются термином «сконструированная белковая конструкция». Человеческие моноспецифические антитела, продуцируемые животными, отличными от человека (такими как мыши), сконструированными для воссоздания иммунной системы человека, также не охватываются термином «сконструированная белковая конструкция». Например, адалимумаб не является сконструированной белковой конструкцией. В одном варианте осуществления сконструированная белковая конструкция не представляет собой химерное антитело, в частности – не представляет собой моноспецифическое химерное антитело. В другом варианте осуществления сконструированная белковая конструкция не представляет собой гуманизированное антитело, в частности, не представляет собой моноспецифическое гуманизированное антитело.

Сконструированные белковые конструкции согласно данному изобретению содержат домен Fc. Домен Fc – это домен антитела, который взаимодействует с рецептором Fc или некоторыми белками системы комплемента для активации иммунной системы, и включает в себя их производные. Домены Fc могут происходить, например, из изоформ IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgM, IgY и IgE. Домены Fc, полученные из изоформ IgG, IgA и IgD, содержат два одинаковые фрагмента белковой цепи, соединенные дисульфидными связями, каждый из которых происходит из второго и третьего константных доменов тяжелой цепи антитела. Домены Fc, полученные из изоформ IgM и IgE, содержат три одинаковые фрагмента белковой цепи, соединенные дисульфидными связями, каждый из которых получен из второго, третьего и четвертого константных доменов тяжелой цепи антитела. Необязательно, домены Fc могут

быть гликозилированными. Наиболее подходящим доменом Fc является домен Fc IgG, особенно IgG1 или IgG4 и, в частности, IgG1. Домены Fc, как правило, могут иметь молекулярную массу, составляющую 25-40 кДа, которая может быть более высокой в случае гликозилированных доменов Fc. Производные доменов Fc, которые охватываются данным термином, включают в себя домены, известные как Fcab, в которых домен Fc модифицирован для включения сайта связывания с антигеном (см. работу Protein Engineering, Design and Selection (2017): 30 (9), 657-671). Другие примеры производных включают в себя конъюгированные производные, например, такие как сконструированные белковые конструкции, содержащие домен Fc, конъюгированный с другим фрагментом. Такие фрагменты включают в себя химически инертные полимеры, такие как ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления домен Fc содержит одну или более модификаций, которые изменяют одно или более свойств сконструированной белковой конструкции, таких как период полужизни в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание с рецептором Fc, и/или эффекторную функцию (например, антигензависимую клеточную цитотоксичность).

В варианте осуществления конструкция представляет собой слияние домена Fc с гетерологичным полипептидом. Одна, а предпочтительно обе цепи домена Fc связаны (т. е. слиты) с гетерологичным полипептидом. Гетерологичный полипептид представляет собой полипептид, который естественным образом не обнаруживается в непрерывной последовательности с доменом Fc или его цепью и, в частности, не является антигенсвязывающей частью антитела (т. е. частью Fab). Подходящим образом каждая цепь домена Fc связана (т. е. слита) с одним и тем же гетерологичным полипептидом так, что сконструированная белковая конструкция является гомодимерной.

В варианте осуществления гетерологичный полипептид обладает способностью связывать лиганд, предпочтительно – специфический лиганд. Гетерологичный полипептид может обладать способностью взаимодействовать с другим белком, например, белком, который играет определенную роль в организме человека (таким как, без ограничения, цитокин). В варианте осуществления гетерологичный полипептид выбран из цитокинов, факторов роста, факторов свертывания крови, ферментов, рецепторных белков, агонистов GLP-1 и их функциональных фрагментов и доменов.

В варианте осуществления гетерологичный полипептид обладает способностью связываться с фактором некроза опухоли (ФНО, англ. «TNF»), например, ФНО α , и,

например, может включать в себя рецептор ФНО, например, рецептор ФНО 2, особенно его растворимую форму. В варианте осуществления гетерологичный полипептид обладает способностью связываться с мембранными белками, такими как CD80 или CD86, и, например, включает в себя внеклеточный домен CLTA-4 или его часть. В варианте осуществления гетерологичный полипептид обладает способностью связываться с VEGF и, например, содержит внеклеточный домен VEGFR1 и/или VEGFR2, или его часть. В варианте осуществления гетерологичный полипептид обладает способностью связываться с ИЛ-1 и, например, содержит внеклеточный домен интерлейкинов, таких как ИЛ-1P11 и/или ИЛ-1RAcP, или его часть. В варианте осуществления гетерологичный полипептид обладает способностью связываться с рецептором тромбopoэтина, таким как c-Mpl. В варианте осуществления гетерологичный полипептид представляет собой фактор свертывания крови, такой как фактор VIII или фактор IX, или его часть. В варианте осуществления гетерологичный полипептид представляет собой белок hActRIIb или его производное. В варианте осуществления гетерологичный полипептид представляет собой ингибитор протеазы. В варианте осуществления гетерологичный полипептид представляет собой агонист GLP-1.

Иллюстративные сконструированные белковые конструкции, которые содержат домен Fc, включают в себя этанерцепт, абатацепт, белатацепт, афлиберцепт, рилонацепт, ромиплостим, элоклат, луспатерцепт, дулаглутид и алпроликс. В одном варианте осуществления сконструированная белковая конструкция представляет собой дулаглутид. В одном варианте осуществления сконструированная белковая конструкция представляет собой абатацепт. В одном варианте осуществления сконструированная белковая конструкция представляет собой афлиберцепт. В одном варианте осуществления сконструированная белковая конструкция представляет собой этанерцепт.

В варианте осуществления белковая конструкция действительно содержит антигенсвязывающую часть антитела (т. е. часть Fab). В варианте осуществления сконструированная белковая конструкция представляет собой биспецифическое антитело в формате 4-цепочечного антитела, имеющее две разные переменные области связывания. В варианте осуществления сконструированная белковая конструкция представляет собой биспецифическое антитело в формате 2-цепочечного антитела (т. е. антитело, содержащее только тяжелую цепь), имеющее две разные переменные области связывания. Антитела, содержащее только тяжелую цепь, могут, например, быть получены из антител, выделенных из верблюдовых. Будь то в 2-цепочечном или 4-цепочечном формате, такое

биспецифическое антитело может, например, иметь пару из 3 CDR для плеч а и b антитела, обозначаемых CDR1a, CDR2a, CDR3a, CDR1b, CDR2b и CDR3b, где CDR1a не является той же, что и CDR1b, и/или CDR2a не является той же, что и CDR2b, и/или CDR3a не является той же, что и CDR3b. Подходящим образом, ни одна из 6 CDR не является той же, что и любая другая из 6 CDR.

В варианте осуществления сконструированная белковая конструкция представляет собой биспецифическое антитело или триспецифическое антитело в формате Fcab, при этом домен Fc модифицирован так, чтобы включать в себя антигенсвязывающий сайт.

В определенных вариантах осуществления две сконструированные белковые конструкции могут связываться, например, посредством дисульфидных связей, с образованием димерного белка.

В варианте осуществления сконструированная белковая конструкция содержит домен Fc IgG и два или более (например, два, три, четыре, пять или шесть, например, два или четыре) переменных доменов цепи иммуноглобулина. При употреблении в контексте данного документа переменный домен цепи иммуноглобулина представляет собой происходящий из антитела домен, который связывается с антигеном. Переменные домены цепей иммуноглобулинов могут быть связаны с доменом Fc напрямую или могут быть связаны с доменом Fc непрямо, например, через промежуточный константный домен. Специфичность переменного домена цепи иммуноглобулина определяется областями CDR, и переменный домен цепи иммуноглобулина, как правило, содержит три CDR. Иллюстративные переменные домены цепей иммуноглобулинов включают в себя домены V_H и V_L , происходящие из обычного 4-цепочечного антитела, и домены V_{HN} , происходящие из антител, содержащих только тяжелую цепь, например, обнаруженных у верблюдовых. В варианте осуществления сконструированная белковая конструкция содержит домен Fc IgG, образованный из двух цепей, каждая из которых напрямую или непрямо связана с одним или большим числом (например, с одним, двумя или тремя, например, с одним или двумя) переменными доменами цепей иммуноглобулинов. В варианте осуществления сконструированная белковая конструкция содержит домен Fc IgG, образованный из двух цепей, каждая из которых напрямую связана с одним или большим числом (например, с двумя) переменными доменами цепей иммуноглобулинов. При употреблении в контексте данного документа термин «напрямую связана» означает непосредственно связана (т. е. слита), необязательно – с помощью пептидного линкера, и без каких-либо промежуточных

доменов, которые не являются переменными доменами цепей иммуноглобулинов (например, константными доменами). В варианте осуществления сконструированная белковая конструкция содержит домен Fc IgG, образованный из двух цепей, каждая из которых непрямо связана с одним или большим числом (например, с двумя) переменными доменами цепей иммуноглобулинов. При употреблении в контексте данного документа термин «непрямо связана» означает связана (т. е. слита) с одним или несколькими промежуточными доменами (например, константными доменами). Пептидные линкеры могут присутствовать между различными доменами. В варианте осуществления каждый из переменных доменов цепей иммуноглобулинов обладает одинаковой специфичностью (т. е. сконструированная белковая конструкция является моноспецифической), например, каждый из переменных доменов цепей иммуноглобулинов является одинаковым. В варианте осуществления конструкция содержит переменные домены цепей иммуноглобулинов, имеющие две или более (например, две) разные специфичности (т. е. сконструированная белковая конструкция является мультиспецифической, например, биспецифической), например, по меньшей мере два переменных домена цепей иммуноглобулинов не являются одинаковыми.

Сконструированная белковая конструкция предпочтительно является терапевтической сконструированной белковой конструкцией. Такая сконструированная белковая конструкция обладает желаемой терапевтической или профилактической активностью и показана для лечения, ингибирования или профилактики заболевания или медицинского нарушения. В определенных вариантах осуществления сконструированная белковая конструкция является по существу чистой, то есть композиция содержит единственную сконструированную белковую конструкцию и не содержит значительное количество какого-либо дополнительного белка. В предпочтительных вариантах осуществления сконструированная белковая конструкция содержит по меньшей мере 99%, предпочтительно – по меньшей мере 99,5%, и более предпочтительно – по меньшей мере около 99,9% от общего содержания белка в композиции. В предпочтительных вариантах осуществления сконструированная белковая конструкция является достаточно чистой для использования в фармацевтической композиции.

Сконструированная белковая конструкция подходящим образом присутствует в композиции в концентрации около 1-400 мг/мл, подходящим образом – 10-200 мг/мл, более подходящим образом – 20-100 мг/мл, например, около 50 мг/мл.

Композиция может содержать неионогенный сурфактант. Неионогенный сурфактант может быть выбран, например, из группы, состоящей из полисорбата, алкилгликозида, алкилового эфира полиэтиленгликоля, блок-сополимера полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, и алкилфенилового эфира полиэтиленгликоля.

Особенно подходящий класс неионогенных сурфактантов представляет собой полисорбаты (сложные эфиры жирных кислот этоксилированного сорбитана), такие как полисорбат 20 или полисорбат 80. Полисорбат 20 представляет собой сложный моноэфир, образованный из лауриновой кислоты и полиоксиэтилен (20) сорбитана, где число 20 указывает на число оксиэтиленовых групп в молекуле. Полисорбат 80 представляет собой сложный моноэфир, образованный из олеиновой кислоты и полиоксиэтилен (20) сорбитана, где число 20 указывает на число оксиэтиленовых групп в молекуле. Полисорбат 20 известен под целым рядом торговых марок, включительно, в частности, с Tween 20, а также Alkest TW 20. Полисорбат 80 известен под целым рядом торговых марок, включительно, в частности, с Tween 80, а также Alkest TW 80. Другие подходящие полисорбаты включают в себя полисорбат 40 и полисорбат 60.

Другой подходящий класс неионогенных сурфактантов представляет собой алкилгликозиды, особенно додецилмальтозид. Другие алкилгликозиды включают в себя додецилгликозид, октилгликозид, октилмальтозид, децилгликозид, децилмальтозид, тридецилгликозид, тридецилмальтозид, тетрадецилгликозид, тетрадецилмальтозид, гексадецилгликозид, гексадецилмальтозид, монооктаноат сахарозы, монодеcanoат сахарозы, монододеcanoат сахарозы, монотридеcanoат сахарозы, монотетрадеcanoат сахарозы и моногексадеcanoат сахарозы.

Другой подходящий класс неионогенных сурфактантов представляет собой алкиловые эфиры полиэтиленгликоля, особенно те, которые известны под торговой маркой Brij, например, выбранные из полиэтиленгликоль (2) гексадецилового эфира (Brij 52), полиэтиленгликоль (2) олеилового эфира (Brij 93) и полиэтиленгликоль (2) додецилового эфира (Brij L4). Другие подходящие сурфактанты Brij включают в себя полиэтиленгликоль (4) лауриловый эфир (Brij 30), полиэтиленгликоль (10) лауриловый эфир (Brij 35), полиэтиленгликоль (20) гексадециловый эфир (Brij 58) и полиэтиленгликоль (10) стеариловый эфир (Brij 78).

Другой подходящий класс неионогенных сурфактантов представляет собой блок-сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, также известные как полуксамеры, особенно полуксамер 188, полуксамер 407, полуксамер 171 и полуксамер 185. Полуксамеры также известны под торговыми марками Pluronic или Koliphors. Например, полуксамер 188 продается как Pluronic F-68.

Другой подходящий класс неионогенных сурфактантов представляет собой алкилфениловые эфиры полиэтиленгликоля, особенно 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоль, также известный под торговой маркой Triton X-100.

В одном варианте осуществления неионогенный сурфактант представляет собой полисорбат или полуксамер и, подходящим образом, представляет собой полисорбат. Концентрация неионогенного сурфактанта в композиции, как правило, будет находиться в диапазоне 10-2000 мкг/мл, например, 50-1000 мкг/мл, 100-500 мкг/мл или около 200 мкг/мл.

Композиции согласно данному изобретению могут дополнительно содержать консервант, такой как фенольный или бензиловый консервант. Консервант подходящим образом выбран из группы, состоящей из фенола, *m*-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, пропилпарабена и метилпарабена, в частности фенола, *m*-крезола и бензилового спирта. Концентрация консерванта, как правило, составляет 10-100 мМ, например, 20-80 мМ, например, 25-50 мМ. Оптимальную концентрацию консерванта в композиции выбирают так, чтобы обеспечить соответствие композиции фармакопейному тесту на антимикробную эффективность (Pharmacopoeia Antimicrobial Effectiveness Test; USP <51>, Vol. 32).

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем рK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом рK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции;
- одну или более нейтральных аминокислот; и
- незаряженный модификатор тоничности;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ. В другом конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 8 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 6,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем pK_a в диапазоне от около 4,0 до около 9,5, например, от около 5,0 до около 9,5, при этом pK_a находится в пределах 2 единиц рН, например, в пределах 1,5 единиц рН, например, в пределах 1 единицы рН, от рН композиции;
- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и
- незаряженный модификатор тоничности;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ. В другом конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 8 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc, которая представляет собой биспецифическое антитело в формате 2-цепочечного антитела, имеющее две разные переменные области связывания;
- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с

показателем pK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, и при этом pK_a находится в пределах 2 единиц рН, например, в пределах 1,5 единиц рН, например, в пределах 1 единицы рН, от рН композиции;

- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и
- незаряженный модификатор тоничности, например, полиол;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ. В другом конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 8 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем pK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом pK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции;
- одну или более нейтральных аминокислот;
- незаряженный модификатор тоничности, например, полиол; и
- неионогенный сурфактант;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ. В другом конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 8 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;

- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем pK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом pK_a находится в пределах 2 единиц pH от pH композиции;

- одну или более нейтральных аминокислот, например, выбранных из глицина, метионина, пролина и аланина;

- незаряженный модификатор тоничности, например, полиол; и

- консервант;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ. В другом конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 8 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий pH в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc , которая представляет собой слияние домена Fc с гетерологичным белком, выбранным из цитокинов, факторов роста, факторов свертывания крови, ферментов, рецепторных белков, агонистов $GLP-1$ и их функциональных фрагментов и доменов;

- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем pK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом pK_a находится в пределах 2 единиц pH от pH композиции;

- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и

- незаряженный модификатор тоничности, например, полиол;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ. В другом конкретном подварианте осуществления

один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 8 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc, которая представляет собой биспецифическое антитело в формате 4-цепочечного антитела, имеющее две разные переменные области связывания;

- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем рK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом рK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции;

- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и

- незаряженный модификатор тоничности, например, полиол;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 5 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 до около 3 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc, которая представляет собой биспецифическое антитело в формате 2-цепочечного антитела, имеющее две разные переменные области связывания;

- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем рK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом рK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции;

- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и

- незаряженный модификатор тоничности, например, полиол;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 5 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном

конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 6,0 до около 7,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc, которая представляет собой биспецифическое антитело в формате 2-цепочечного антитела, имеющее две разные переменные области связывания;

- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем рK_a в диапазоне от около 5,0 до около 8,5, и при этом рK_a находится в пределах 2 единиц рН, например, в пределах 1,5 единиц рН, например, в пределах 1 единицы рН, от рН композиции;

- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и

- незаряженный модификатор тоничности, например, полиол;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 5 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ. В одном конкретном подварианте осуществления один или более буферов присутствуют в указанной композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 3 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 6,0 до около 8,5, например, от около 6,5 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;

- буфер, выбранный из фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS);

- одну или более нейтральных аминокислот, например, выбранных из пролина и глицина; и

- незаряженный модификатор тоничности, например, сахарозу;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 6,0 до около 8,5, например, от около 6,5 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- буфер, выбранный из фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS);
- одну или более нейтральных аминокислот, например, выбранных из пролина и глицина; и
- незаряженный модификатор тоничности, например, сахарозу;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ и, подходящим образом, меньше чем 10 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 5,0 до около 8,0, например, от около 5,0 до около 7,5, например, от около 5,5 до около 7,5, например, от около 6,0 до около 7,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- буфер, выбранный из фосфата и цитрата; и
- незаряженный модификатор тоничности, например, сахарозу;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 5,0 до около 8,0, например, от около 5,0 до около 7,5, например, от около 5,5 до около 7,5, например, от около 6,0 до около 7,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- буфер, выбранный из фосфата и цитрата; и
- незаряженный модификатор тоничности, например, сахарозу;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ, подходящим образом – меньше чем 10 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 5,0 до около 8,0, например, от около 5,0 до около 7,5, например, от около 5,5 до около 7,5, например, от около 6,0 до около 7,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- буфер, выбранный из фосфата и цитрата;
- одну или более нейтральных аминокислот, например, выбранных из пролина и глицина; и
- незаряженный модификатор тоничности, например, сахарозу;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 5,0 до около 8,0, например, от около 5,0 до около 7,5, например, от около 5,5 до около 7,5, например, от около 6,0 до около 7,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- буфер, выбранный из фосфата и цитрата;
- одну или более нейтральных аминокислот, например, выбранных из пролина и глицина; и
- незаряженный модификатор тоничности, например, сахарозу;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 5,5 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ, подходящим образом – меньше чем 10 мМ.

В одном варианте осуществления в данном изобретении представлен водный раствор-композиция, имеющий рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащий:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc IgG и два или более переменных доменов цепи иммуноглобулина;
- один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с pK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, при этом pK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции, и, например, выбранные из цитрата, гистидина, малеата, тартрата, лактата, бензоата, ацетата, бикарбоната, фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS);

- неионогенный сурфактант;
- незаряженный модификатор тоничности, выбранный из глицерола, 1,2-пропандиола, маннита, сорбита, сахарозы, трегалозы, ПЭГ300 и ПЭГ400;
- и
- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации от около 1 мМ до около 10 мМ; при этом общая ионная сила композиции, исключая вклад сконструированной белковой конструкции, составляет меньше чем около 20 мМ (например, меньше чем около 10 мМ); и при этом осмолярность композиции находится в диапазоне от около 200 мОсм/л до около 500 мОсм/л, например, от около 350 мОсм/л до около 500 мОсм/л.

Подходящим образом композиция согласно данному изобретению остается прозрачным раствором после хранения при 2-8 °С на протяжении длительного периода времени, например, на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

Подходящим образом композиция согласно данному изобретению остается прозрачным раствором после хранения при 25 °С на протяжении длительного периода времени, например, на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

Подходящим образом композиция согласно данному изобретению остается прозрачным раствором после хранения при 30 °С на протяжении длительного периода времени, например, на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

Подходящим образом композиция согласно данному изобретению остается в виде прозрачного раствора после хранения при температуре 40 °С или 50 °С (т. е. температурах, подходящих для ускоренных испытаний стабильности) в течение периода времени, такого как по меньшей мере 1 сутки, 3 суток, 1 неделя, 2 недели или 4 недели.

Подходящим образом композиция согласно данному изобретению обладает улучшенной стабильностью при хранении при температуре 2-8 °С или при повышенной

температуре по сравнению с эквивалентной композицией, содержащей более высокую концентрацию того же буфера или тех же буферов.

Подходящим образом композиция согласно данному изобретению обладает улучшенной стабильностью при хранении при температуре 2-8 °С или при повышенной температуре по сравнению с эквивалентной композицией, которая имеет более высокую общую ионную силу.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит суммарно не больше чем 5% примесей, например, суммарно не больше чем 4%, например, суммарно не больше чем 3%, например, суммарно не больше чем 2% примесей (от общей массы сконструированной белковой конструкции в композиции, как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), после хранения при 2-8 °С на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит суммарно не больше чем 5% примесей, например, суммарно не больше чем 4%, например, суммарно не больше чем 3%, например, суммарно не больше чем 2% примесей (от общей массы сконструированной белковой конструкции в композиции, как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), после хранения при 25 °С на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит суммарно не больше чем 5% примесей, например, суммарно не больше чем 4%, например, суммарно не больше чем 3%, например, суммарно не больше чем 2% примесей (от общей массы сконструированной белковой конструкции в композиции, как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), после хранения при 30 °С на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит суммарно не больше чем 5% примесей, например, суммарно не больше чем 4%, например, суммарно не больше чем 3%, например, суммарно не больше чем 2% примесей

(от общей массы сконструированной белковой конструкции в композиции, как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), после хранения при 40 °С на протяжении по меньшей мере 1 суток, 3 суток, 1 недели, 2 недель или 4 недель.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит более низкий уровень примесей (как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), чем коммерчески доступная композиция, содержащая тот же фармацевтический ингредиент (как измерено с помощью той же методики / тех же методик), после хранения при 2-8 °С на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит более низкий уровень примесей (как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), чем коммерчески доступная композиция, содержащая тот же фармацевтический ингредиент (как измерено с помощью той же методики / тех же методик), после хранения при 25 °С на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит более низкий уровень примесей (как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), чем коммерчески доступная композиция, содержащая тот же фармацевтический ингредиент (как измерено с помощью той же методики / тех же методик), после хранения при 30 °С на протяжении по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

В одном варианте осуществления композиция согласно данному изобретению содержит более низкий уровень примесей (как измерено с помощью катионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру или аналогичной подходящей методикой), чем коммерчески доступная композиция, содержащая тот же фармацевтический ингредиент (как измерено с помощью той же методики / тех же

методик), после хранения при 40 °С или 50 °С на протяжении по меньшей мере 1 суток, 3 суток, 1 недели, 2 недель или 4 недель.

В варианте осуществления композиция согласно данному изобретению представляет собой композицию для применения в терапии. В варианте осуществления композиция согласно данному изобретению представляет собой фармацевтическую композицию. Композиции, например, предназначенные для внутривенного введения, могут быть приготовлены в виде концентратов для разбавления перед введением.

Все варианты осуществления, описанные выше в отношении водного раствора-композиции, в равной степени применимы к способам и применениям согласно данному изобретению.

Также представлен контейнер, например, изготовленный из пластика или стекла, содержащий одну дозу или множество доз композиции, как описано в данном документе. Контейнер может представлять собой, например, флакон, предварительно заполненный шприц, предварительно заполненный инфузионный пакет или картридж, предназначенный в качестве сменного элемента для использования с устройством для инъекций.

Композиции согласно данному изобретению могут быть подходящим образом упакованы для инъекции, особенно для внутривенной инфузии, внутривенной инъекции, подкожной инъекции или внутримышечной инъекции.

В аспекте данного изобретения представлено инъекционное или инфузионное устройство, в частности устройство, приспособленное для подкожной или внутримышечной инъекции или инфузии, для однократного или многократного использования, включающее в себя контейнер, содержащий одну дозу или множество доз композиции согласно данному изобретению, вместе с иглой для инъекции. В варианте осуществления контейнер представляет собой сменный картридж, который содержит множество доз. В одном варианте осуществления устройство для инъекций имеет форму ручки. В одном варианте осуществления устройство для инъекций имеет форму предварительно заполненного шприца. В одном варианте осуществления устройство для инъекций имеет форму помпы или другого носимого устройства для инъекций или инфузий.

Ожидается, что композиции согласно данному изобретению будут обладать хорошей физической и химической стабильностью, как описано в данном документе.

Примеры

Общие способы

Способы оценки стабильности белковой конструкции

(a) Визуальная оценка

Подходящим образом, видимые частицы обнаруживают с помощью монографии Европейской фармакопеи, 2.9.20. (Загрязнение твердыми частицами: видимые частицы). Требуемое устройство состоит из смотровой станции, включающей в себя:

- матовую черную панель соответствующего размера, удерживаемую в вертикальном положении
- белую панель соответствующего размера с антибликовым покрытием, удерживаемую в вертикальном положении рядом с черной панелью
- регулируемый держатель лампы, оснащенный подходящим источником белого света с абажуром и подходящим рассеивателем света (обзорный осветитель с двумя лампами мощностью по 13 Вт, подходят люминесцентные лампы длиной 525 мм каждая). Интенсивность освещения в точке обзора поддерживается в диапазоне от 2000 люкс до 3750 люкс.

Все приклеенные этикетки удаляют с контейнера, а внешнюю сторону промывают и высушивают. Контейнер мягко взбалтывают или переворачивают, следя за тем, чтобы не образовывались пузырьки воздуха, и наблюдают в течение около 5 секунд перед белой панелью. Процедуру повторяют перед черной панелью. Регистрируют наличие каких-либо частиц.

Визуальные оценки ранжируются следующим образом:

визуальная оценка А: прозрачный раствор, почти не содержащий частиц, <10 частиц

визуальная оценка В: частицы видны только под лампой

визуальная оценка С: значительное видимое изменение внешнего вида при нормальных лабораторных условиях

В то время как частицы в образцах с визуальными оценками С четко обнаруживаются при случайной визуальной оценке при нормальном освещении, образцы с визуальными оценками А и В обычно выглядят как прозрачные растворы при том же оценивании. Образцы с визуальными оценками А и В считаются «прошедшими» оценивание; образцы с визуальной оценкой С считаются «провалившимися» оценивание.

(b) Эксклюзионная хроматография по размеру (ЭХР)

Количество высокомолекулярных соединений измеряют с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии по размеру TSK Gel G3000 SWXL, 300×7,8 мм (или эквивалентной), с защитной колонкой. Подвижная фаза представляет собой натрийфосфатный буфер с pH 6,75, со скоростью потока 1 мл/мин, объемом инъекции 20 мкл и детекцией при 280 нм. Результаты выражают в % высокомолекулярных соединений (ВМС), т. е. в виде суммы площадей всех пиков, соответствующих агрегированному белку, по отношению к сумме всех связанных с белком пиков на хроматограмме. Небольшая вариабельность от момента времени к моменту времени может наблюдаться в абсолютных значениях % площади (мономер, ВМС и низкомолекулярные соединения (НМС)), например, из-за многократного использования колонки для эксклюзионной хроматографии. Однако в течение заданного промежутка времени образцы тестируются с использованием колонки в одних и тех же условиях, поэтому значения, полученные в течение заданного промежутка времени, представляют собой очень хороший показатель относительной стабильности белка в тестируемых водных растворах. Увеличение % ВМС означает изменение, наблюдаемое в % ВМС в данный момент времени, по сравнению со значением % ВМС в нулевой момент времени (т. е. непосредственно перед инкубацией при температуре хранения).

(c) Катионообменная хроматография (КОХ)

Количество родственных соединений измеряют с использованием колонки Protein-Pak Hi Res SP. Подвижная фаза А представляет собой 20 мМ натрий фосфат (pH 6,5); подвижная фаза В представляет собой 20 мМ натрий фосфат + 0,5 М NaCl (pH 6,0). Используют следующее градиентное элюирование: 0 мин – 100% А, 4 мин – 80% А, 10 мин – 55% А, 12 мин – 0% А. Скорость потока – 1,0 мл/мин; объем инъекции составляет 3 мкл, с УФ-детекцией при 214 нм. Результаты выражают в % от главного пика (т. е. нативного белка), % кислых соединений и % основных соединений. % Родственных соединений = % кислых соединений + % основных соединений.

Пример 1 – иллюстративные лекарственные составы

Могут быть приготовлены следующие иллюстративные лекарственные составы:

Пример А:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	1 мМ
Сахароза	300 мМ

Вода для инъекций qs
рН скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример В:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий ацетат	3 мМ
Сахароза	300 мМ

Вода для инъекций qs
рН скорректирован до 5,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример С:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий ацетат	3 мМ
Сахароза	300 мМ
Пролин	100 мМ

Вода для инъекций qs
рН скорректирован до 5,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример D:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	3 мМ
Сахароза	300 мМ

Вода для инъекций qs
рН скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример E:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
TRIS	1 мМ
Сахароза	300 мМ

Вода для инъекций qs
рН скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример F:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
TRIS	3 мМ

Сахароза	300 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример G:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
TRIS	3 мМ
Сахароза	500 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример H:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	1 мМ
Сахароза	300 мМ
Пролин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример I:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
TRIS	1 мМ
Сахароза	300 мМ
Пролин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример J:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	1 мМ
Сахароза	300 мМ
Глицин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример К:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	1 мМ
Сахароза	400 мМ
Глицин	150 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример L

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
TRIS	1 мМ
Сахароза	300 мМ
Глицин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример M:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	7 мМ
Сахароза	300 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример N:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий ацетат	7 мМ
Сахароза	300 мМ
Пролин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 5,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример O:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	7 мМ
Сахароза	300 мМ

Вода для инъекций qs
рН скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример Р:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	7 мМ
Сахароза	300 мМ
Пролин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

рН скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример Q:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	9 мМ
Сахароза	300 мМ
Вода для инъекций	qs

рН скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример R:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий ацетат	9 мМ
Сахароза	300 мМ
Пролин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

рН скорректирован до 5,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример S:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
Натрий фосфат	9 мМ
Сахароза	300 мМ
Вода для инъекций	qs

рН скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

Пример T:

Fc-слитый белок*	50 мг/мл
------------------	----------

Натрий фосфат	9 мМ
Сахароза	300 мМ
Пролин	100 мМ
Вода для инъекций	qs

pH скорректирован до 7,0 с помощью соляной кислоты или натрий гидроксида

*Fc-слитый белок представляет собой: (1) этанерцепт, (2) афлиберцепт или (3) дулаглутид.

Примеры AA-TT:

Готовят те же лекарственные составы, что и в примерах А-Т, за исключением того, что вместо Fc-слитого белка используют сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc, которая представляет собой биспецифическое антитело.

Примеры AAA-TTT:

Готовят те же лекарственные составы, что и в примерах А-Т, за исключением того, что вместо Fc-слитого белка используют сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc, которая представляет собой триспецифическое антитело.

Стабильность лекарственных составов определяют посредством визуальной оценки, ЭХР и КОХ (см. «Общие способы») после инкубации при 40 °С на протяжении 2, 4 и 8 недель.

Стабильность лекарственных составов определяют посредством визуальной оценки, ЭХР и КОХ (см. «Общие способы») после инкубации при 25 °С на протяжении 2, 4, 8 и 12 недель.

Стабильность лекарственных составов определяют посредством визуальной оценки, ЭХР и КОХ (см. «Общие способы») после инкубации при 2-8 °С на протяжении 2, 4, 8 и 12 недель.

Пример 2 – влияние концентрации буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность дулаглутида при 40 °С и 50 °С

Исследовали влияние концентрации буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность дулаглутида (1 мг/мл). Тестировали цитратный буфер и фосфатный буфер. В

качестве заряженного модификатора тоничности использовали натрий хлорид (150 мМ), а в качестве незаряженного модификатора тоничности использовали сахарозу (250 мМ). Показатель рН всех тестируемых лекарственных составов корректировали до 6,5. В дополнение к этому, лекарственный состав коммерческого продукта дулаглутида (Trulicity) использовали в качестве контрольного лекарственного состава для сравнения. В таблице 1 обобщены протестированные лекарственные составы. На все лекарственные составы воздействовали температурой 40 °С и 50 °С на протяжении 4 недель. За стабильностью дулаглутида наблюдали путем мониторинга степени образования высокомолекулярных соединений с помощью ЭХР.

Таблица 1: протестированные лекарственные составы дулаглутида. Все лекарственные составы содержали дулаглутид (1 мг/мл) и имели рН, скорректированный до 6,5.

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий фосфат (мМ)	Натрий хлорид (мМ)	Сахароза (мМ)	Маннит (мМ)	Tween 80 (мг/мл)
2-1	1	-	150	-	-	-
2-2	5	-	150	-	-	-
2-3	10	-	150	-	-	-
2-4	50	-	150	-	-	-
2-5	1	-	-	250	-	-
2-6	3	-	-	250	-	-
2-7	5	-	-	250	-	-
2-8	7	-	-	250	-	-
2-9	10	-	-	250	-	-
2-10	50	-	-	250	-	-
2-11	-	1	150	-	-	-
2-12	-	5	150	-	-	-
2-13	-	10	150	-	-	-
2-14	-	50	150	-	-	-
2-15	-	1	-	250	-	-
2-16	-	3	-	250	-	-
2-17	-	5	-	250	-	-

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий фосфат (мМ)	Натрий хлорид (мМ)	Сахароза (мМ)	Маннит (мМ)	Tween 80 (мг/мл)
2-18	-	7	-	250	-	-
2-19	-	10	-	250	-	-
2-20	-	50	-	250	-	-
2-21 (Контрольный состав)	10*	-	-	-	250	0,067

*получают путем смешивания натрий цитрата (9,3 мМ) с лимонной кислотой (0,7 мМ)

Все протестированные лекарственные составы прошли визуальный тест (визуальная оценка А) после хранения при обеих температурах. Степень образования ВМС в лекарственных составах с 2-1 по 2-21 после хранения при температурах 50 °С и 40 °С показана в таблице 2. Степень образования ВМС была наиболее низкой в лекарственных составах, содержащих очень низкую концентрацию буфера и незаряженный модификатор тоничности. В присутствии сахарозы не наблюдалось заметного увеличения ВМС при температуре 40°С в композициях, содержащих вплоть до 5 мМ цитратного буфера. Степень образования ВМС увеличивалась при более высоких концентрациях цитратного буфера. Подобным образом, при более усиленной «нагрузке» – воздействии температурой 50 °С – степень образования ВМС была пропорциональна концентрации цитратного буфера и была очень низкой при концентрациях буфера 5 мМ или меньше. Подобные наблюдения были сделаны при использовании фосфатного буфера. Напротив, образование ВМС наблюдалось в присутствии натрий хлорида при всех концентрациях буфера.

Таблица 2: стабильность дулаглутида (1 мг/мл) при 40 °С и при 50 °С в лекарственных составах с 2-1 по 2-21 на основании оценки способом ЭХР.

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при указанной температуре	
	50 °С (4 недели)	40 °С (4 недели)
2-1	7,97	0,80
2-2	6,73	0,68
2-3	8,33	1,03

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при указанной температуре	
	50 °С (4 недели)	40 °С (4 недели)
2-4	11,18	1,33
2-5	0,06	0
2-6	0,05	0
2-7	2,17	0
2,8	2,66	0
2-9	5,2	0,41
2-10	11,92	1,74
2-11	8,9	0,64
2-12	12,01	0,60
2-13	6,86	0,68
2-14	10,81	0,90
2-15	Не доступно*	Не доступно*
2-16	0,77	0
2-17	3,26	0
2-18	3,71	0,07
2-19	4,56	0,23
2-20	17,44	1,74
2-21 (Контрольный состав)	4,24	0,32

*к сожалению, тестирование данного лекарственного состава не удалось по причинам, не связанным с самим лекарственным составом

Пример 3 – влияние концентрации буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность абатацепта при 50 °С

Исследовали влияние концентрации буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность абатацепта (4,25 мг/мл). Тестировали цитратный буфер и фосфатный буфер. В качестве заряженного модификатора тоничности использовали натрий хлорид (150 мМ), а в качестве незаряженного модификатора тоничности использовали сахарозу (250 мМ). Показатель рН всех тестируемых лекарственных составов корректировали до 6,8. В дополнение к этому, лекарственный состав коммерческого продукта абатацепта (Ogencia)

использовали в качестве контрольного лекарственного состава для сравнения. В таблице 3 обобщены протестированные лекарственные составы. На все лекарственные составы воздействовали температурой 50 °С на протяжении 2 недель. За стабильностью абатацепта наблюдали путем мониторинга степени образования высокомолекулярных соединений с помощью ЭХР.

Таблица 3: протестированные лекарственные составы абатацепта. Все лекарственные составы содержали абатацепт (4,25 мг/мл) и имели рН, скорректированный до 6,8.

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий фосфат (мМ)	Натрий хлорид (мМ)	Сахароза (мМ)	Мальтоза (мМ)
3-1	1	-	150	-	-
3-2	5	-	150	-	-
3-3	10	-	150	-	-
3-4	50	-	150	-	-
3-5	1	-	-	250	-
3-6	3	-	-	250	-
3-7	5	-	-	250	-
3-8	10	-	-	250	-
3-9	50	-	-	250	-
3-10	-	1	150	-	-
3-11	-	5	150	-	-
3-12	-	10	150	-	-
3-13	-	50	150	-	-
3-14	-	1	0	250	-
3-15	-	3	0	250	-
3-16	-	5	0	250	-
3-17	-	10	0	250	-
3-18	-	50	0	250	-
3-19 (Контрольный состав)	-	12,5	25	-	138,8

Все протестированные лекарственные составы прошли визуальный тест (визуальная оценка А) после хранения при температуре 50 °С. Степень образования ВМС в лекарственных составах с 3-1 по 3-19 после хранения при температуре 50 °С представлена в таблице 4. Степень образования ВМС была наиболее низкой в лекарственных составах, содержащих очень низкую концентрацию буфера и незаряженный модификатор тоничности. Степень образования ВМС повышалась с увеличением концентрации буфера, как в случае цитратного буфера, так и в случае фосфатного буфера. Напротив, образование ВМС было очень высоким в присутствии натрий хлорида независимо от концентраций буфера.

Таблица 4: стабильность абатацепта (4,25 мг/мл) при 50 °С в лекарственных составах с 3-1 по 3-19 на основании оценки способом ЭХР.

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 50 °С на протяжении 2 недель
3-1	84,33
3-2	85
3-3	83,39
3-4	85,49
3-5	19,35
3-6	22,92
3-7	34,84
3-8	54,39
3-9	76,36
3-10	83,8
3-11	82,56
3-12	82,78
3-13	83,96
3-14	24,81
3-15	31,36
3-16	38,80
3-17	48,20
3-18	72,71
3-19	70,58

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 50 °С на протяжении 2 недель
(Контрольный состав)	

Пример 4 – влияние концентрации буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность абатацепта при 40 °С

Исследовали влияние концентрации цитратного буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность абатацепта (4,25 мг/мл). В качестве заряженного модификатора тоничности использовали натрий хлорид (150 мМ), а в качестве незаряженного модификатора тоничности использовали сахарозу (250 мМ). Показатель рН всех тестируемых лекарственных составов корректировали до 6,8. В таблице 5 обобщены протестированные лекарственные составы. На все лекарственные составы воздействовали температурой 40 °С на протяжении 2 недель. За стабильностью абатацепта наблюдали путем мониторинга степени образования высокомолекулярных соединений с помощью ЭХР.

Таблица 5: протестированные лекарственные составы абатацепта. Все лекарственные составы содержали абатацепт (4,25 мг/мл) и имели рН, скорректированный до 6,8.

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий фосфат (мМ)	Натрий хлорид (мМ)	Сахароза (мМ)	Мальтоза (мМ)
4-1	1		150	-	
4-2	5		150	-	
4-3	10		150	-	
4-4	50		150	-	
4-5	1		-	250	
4-6	3		-	250	
4-7	5		-	250	
4-8	10		-	250	
4-9	50		-	250	

Все протестированные лекарственные составы прошли визуальный тест (визуальная оценка А) после хранения при температуре 40 °С. Степень образования ВМС в лекарственных составах с 4-1 по 4-9 после хранения при температуре 40 °С представлена в таблице 6. Степень образования ВМС была наиболее низкой в композиции, содержащей очень низкую концентрацию цитратного буфера и незаряженный модификатор тоничности. Степень образования ВМС повышалась с увеличением концентрации цитратного буфера. Напротив, образование ВМС было очень высоким в присутствии натрий хлорида независимо от концентраций буфера.

Таблица 6: стабильность абатацепта (4,25 мг/мл) при 40 °С в лекарственных составах с 4-1 по 4-9 на основании оценки способом ЭХР.

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 40 °С на протяжении 2 недель
4-1	16,55
4-2	17,69
4-3	17,21
4-4	19,64
4-5	2,61
4-6	3,03
4-7	3,80
4-8	4,72
4-9	7,42

Пример 5 – влияние пролина на стабильность абатацепта при 50 °С в присутствии 1 мМ буфера и незаряженного модификатора тоничности

Исследовали влияние пролина (50 мМ) на стабильность абатацепта (4,25 мг/мл) в присутствии 1 мМ буфера и незаряженного модификатора тоничности. В качестве незаряженного модификатора тоничности использовали сахарозу (250 мМ). Показатель рН всех тестируемых лекарственных составов корректировали до 6,8. В таблице 7 обобщены протестированные лекарственные составы. На все лекарственные составы воздействовали температурой 50 °С на протяжении 2 недель. За стабильностью абатацепта наблюдали путем мониторинга степени образования высокомолекулярных соединений с помощью ЭХР.

Таблица 7: протестированные лекарственные составы абатацепта. Все лекарственные составы содержали абатацепт (4,25 мг/мл) и имели рН, скорректированный до 6,8.

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий фосфат (мМ)	Сахароза (мМ)	Пролин (мМ)
5-1	1	-	250	-
5-2	1	-	250	50
5-3	-	1	250	-
5-4	-	1	250	50

Все протестированные лекарственные составы прошли визуальный тест (визуальная оценка А) после хранения при температуре 50 °С. Степень образования ВМС в лекарственных составах с 5-1 по 5-4 после хранения при температуре 50 °С представлена в таблице 8. Присутствие пролина (50 мМ) в композициях, содержащих 1 мМ буфера и сахарозу (250 мМ), приводило к снижению степени образования ВМС.

Таблица 8: стабильность абатацепта (4,25 мг/мл) при 50 °С в лекарственных составах с 5-1 по 5-4 на основании оценки способом ЭХР.

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 50 °С на протяжении 2 недель
5-1	19,35
5-2	17,43
5-3	24,81
5-4	22,58

Пример 6 – влияние пролина и глицина на стабильность абатацепта при 40 °С в присутствии 1 мМ буфера и незаряженного модификатора тоничности

Исследовали влияние пролина (50 мМ) и глицина (50 мМ) на стабильность абатацепта (4,25 мг/мл) в присутствии 1 мМ буфера и незаряженного модификатора тоничности. Тестировали цитратный буфер и фосфатный буфер. В качестве незаряженного модификатора тоничности использовали сахарозу (250 мМ). Показатель рН всех тестируемых лекарственных составов корректировали до 6,8. В таблице 9 обобщены

протестированные лекарственные составы. На все лекарственные составы воздействовали температурой 40 °С на протяжении 2 недель. За стабильностью абатацепта наблюдали путем мониторинга степени образования высокомолекулярных соединений с помощью ЭХР.

Таблица 9: протестированные лекарственные составы абатацепта. Все лекарственные составы содержали абатацепт (4,25 мг/мл) и имели рН, скорректированный до 6,8.

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий фосфат (мМ)	Сахароза (мМ)	Пролин (мМ)	Глицин (мМ)
6-1	1	-	250	-	-
6-2	1	-	250	50	-
6-3	1	-	250	-	50
6-4	-	1	250	-	-
6-5	-	1	250	50	-
6-6	-	1	250	-	50

Все протестированные лекарственные составы прошли визуальный тест (визуальная оценка А) после хранения при температуре 40 °С. Степень образования ВМС в лекарственных составах с 6-1 по 6-6 после хранения при температуре 40 °С представлена в таблице 10. Присутствие пролина (50 мМ) и глицина (50 мМ) в композициях, содержащих 1 мМ буфера и сахарозу (250 мМ), привело к более низкой степени образования ВМС.

Таблица 10: стабильность абатацепта (4,25 мг/мл) при 40 °С в лекарственных составах с 6-1 по 6-6 на основании оценки способом ЭХР.

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 40 °С на протяжении 2 недель
6-1	2,61
6-2	1,64
6-3	1,81
6-4	5,37
6-5	3,69

6-6	4,82
-----	------

Пример 7 – влияние концентрации буфера, модификатора тоничности и нейтральной аминокислоты на стабильность абатацепта при 40 °С в композициях с низкой ионной силой

Исследовали влияние концентрации буфера, модификаторов тоничности и нейтральной аминокислоты на стабильность абатацепта при 40 °С. В качестве буфера использовали лимонную кислоту. Сахарозу и 1,2-пропандиол тестировали в качестве модификаторов тоничности, а пролин тестировали в качестве нейтральной аминокислоты. Показатель рН всех тестируемых лекарственных составов корректировали до 6,8. В таблице 11 обобщены протестированные лекарственные составы. На все лекарственные составы воздействовали температурой 40 °С на протяжении 2 недель и 4 недель. За стабильностью абатацепта наблюдали путем мониторинга степени образования высокомолекулярных соединений с помощью ЭХР.

Таблица 11: протестированные лекарственные составы абатацепта. Все лекарственные составы содержали абатацепт (4,25 мг/мл) и имели рН, скорректированный до 6,8.

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Сахароза (мМ)	1,2-пропандиол (мМ)	Пролин (мМ)
7-1	1	300	-	-
7-2	3	300	-	-
7-3	5	300	-	-
7-4	7	300	-	-
7-5	10	300	-	-
7-6	20	300	-	-
7-7	1	-	300	-
7-8	3	-	300	-
7-9	5	-	300	-
7-10	7	-	300	-
7-11	10	-	300	-
7-12	20	-	300	-
7-13	1	150	-	150
7-14	3	150	-	150

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Сахароза (мМ)	1,2-пропандиол (мМ)	Пролин (мМ)
7-15	5	150	-	150
7-16	7	150	-	150
7-17	10	150	-	150
7-18	20	150	-	150

Все протестированные лекарственные составы прошли визуальный тест (визуальная оценка А) после хранения при температуре 40 °С на протяжении 2 и 4 недель. Степень образования ВМС в лекарственных составах с 7-1 по 7-18 после хранения при температуре 40 °С представлена в таблице 12. Было показано, что степень образования ВМС повышается с увеличением концентрации лимонной кислоты, особенно при концентрации 10 мМ или выше. Было показано, что степень образования ВМС лишь незначительно выше при использовании 1,2-пропандиола в качестве незаряженного модификатора тоничности вместо сахарозы. Добавление нейтральной аминокислоты (пролина) к лекарственным составам, содержащим сахарозу, обеспечивало наиболее низкую степень образования ВМС, даже когда концентрация сахарозы была снижена до 150 мМ.

Таблица 12: стабильность абатацепта (4,25 мг/мл) при 40 °С в лекарственных составах с 7-1 по 7-18 на основании оценки способом ЭХР, рН скорректирован до 6,8.

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 40 °С на протяжении 2 недель	Повышение % ВМС после инкубации при 40 °С на протяжении 4 недель
7-1	2,54	5,00
7-2	2,99	5,93
7-3	3,55	7,03
7-4	4,12	8,23
7-5	4,89	9,99
7-6	6,01	12,87
7-7	2,71	5,36
7-8	3,04	5,99
7-9	3,67	7,30
7-10	4,24	8,56

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 40 °С на протяжении 2 недель	Повышение % ВМС после инкубации при 40 °С на протяжении 4 недель
7-11	5,67	12,12
7-12	7,30	17,44
7-13	1,39	2,49
7-14	1,98	3,75
7-15	2,46	4,58
7-16	3,13	6,05
7-17	4,09	8,88
7-18	5,88	11,84

Сравнительный пример 8 – влияние концентрации буфера, заряда модификатора тоничности и нейтральной аминокислоты на стабильность иммуноглобулина G1 (IgG1) при 30 °С

Исследовали влияние концентрации буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность IgG1 (100 мг/мл). Тестировали цитратный буфер. В качестве заряженного модификатора тоничности использовали натрий хлорид (150 мМ), а в качестве незаряженного модификатора тоничности использовали глицерол (300 мМ). Также исследовали влияние пролина и глицина (50 мМ) на стабильность IgG1 в присутствии 1 мМ буфера и обоих модификаторов тоничности. Все протестированные лекарственные составы содержали полисорбат 80 (0,2 мг/мл) и имели рН, скорректированный до 6,0. В таблице 13 обобщены протестированные лекарственные составы. На все лекарственные составы воздействовали температурой 30 °С на протяжении 8 недель. За стабильностью IgG1 наблюдали путем мониторинга степени образования высокомолекулярных соединений с помощью ЭХР.

Таблица 13: протестированные лекарственные составы IgG1. Все протестированные лекарственные составы содержали IgG1 (100 мг/мл) и полисорбат 80 (0,2 мг/мл), и имели рН, скорректированный до 6,0.

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий хлорид (мМ)	Глицерол (мМ)	Пролин (мМ)	Глицин (мМ)	Ионная сила
8-1	1	150	-	-	-	153,8

Лекарственный состав	Лимонная кислота (мМ)	Натрий хлорид (мМ)	Глицерол (мМ)	Пролин (мМ)	Глицин (мМ)	Ионная сила
8-2	5	150	-	-	-	168,7
8-3	20	150	-	-	-	224,8
8-4	1	-	300	-	-	3,8
8-5	5	-	300	-	-	18,7
8-6	20	-	300	-	-	74,8
8-7	1	-	300	50	-	3,8
8-8	1	-	300	-	50	3,8

Все протестированные лекарственные составы прошли визуальный тест (визуальная оценка А) после хранения при температуре 30 °С. Степень образования ВМС в лекарственных составах с 8-1 по 8-8 после хранения при температуре 30 °С представлена в таблице 14. Степень образования ВМС снижалась с увеличением концентрации буфера как в присутствии натрия хлорида, так и в присутствии глицерола (сравнение лекарственных составов с 8-1 по 8-3 и сравнение лекарственных составов с 8-4 по 8-6). Наблюдалась небольшая тенденция к повышению стабильности при более высокой ионной силе лекарственного состава, когда концентрация лимонной кислоты была низкой (1 или 5 мМ) (сравнение лекарственного состава 8-1 с лекарственным составом 8-4 и сравнение лекарственного состава 8-2 с лекарственным составом 8-5). Данный порядок менялся на противоположный, когда концентрация лимонной кислоты была высокой (20 мМ) (сравнение лекарственного состава 8-3 с лекарственным составом 8-6), хотя в этом случае ионная сила обоих лекарственных составов была выше, чем 70 мМ. Присутствие нейтральной аминокислоты (пролина или глицина) приводило к очень слабому повышению степени образования ВМС.

Таблица 14: стабильность IgG1 (100 мг/мл) при 30 °С в лекарственных составах с 8-1 по 8-8 на основании оценки способом ЭХР.

Лекарственный состав	Повышение % ВМС после инкубации при 30 °С на протяжении 8 недель
8-1	6,28
8-2	5,15

8-3	4,41
8-4	6,58
8-5	5,48
8-6	4,27
8-7	6,67
8-8	6,68

Краткое описание примеров

Данные из примеров 2-7 демонстрируют, что лекарственные составы сконструированной белковой конструкции, содержащей домен Fc, стабильны при содержании буфера вплоть до 5 мМ и при низкой ионной силе (например, меньше чем 20 мМ, исключая вклад сконструированной белковой конструкции). Более высокие концентрации буфера, в частности, выше 10 мМ, и более высокая ионная сила, в частности, выше 20 мМ (исключая вклад сконструированной белковой конструкции), были дестабилизирующими. Присутствие нейтральной аминокислоты способствовало дальнейшей стабилизации. Удивительно, но это противоположно поведению, проявляемому протестированным 4-цепочечным антителом (тип IgG1). Данные из сравнительного примера 8 показывают, что данное антитело было более стабильным при более высоких концентрациях буфера и более высокой ионной силе. Присутствие нейтральной аминокислоты способствовало дальнейшей дестабилизации.

Не ограничиваясь конкретной теорией авторы данного изобретения полагают, что, по сравнению с природными белками или рекомбинантными белками на основе природных структурных матриц (например, иммуноглобулинов), экспрессия новых сконструированных белковых конструкций, содержащих домен Fc, приводит к большему количеству гидрофобных участков на поверхности белка, а также к большей экспозиции участков нестабильности, таких как области, склонные к гидролитическому расщеплению. Это, в свою очередь, приводит к большей склонности к агрегации и структурной деградации. Данное изобретение сочетает в себе особенности лекарственного состава, которые, не ограничиваясь теорией, как полагают, работают согласованно для экранирования неестественных гидрофобных участков, а также минимизации скорости обмена протонами в неестественно открытых участках нестабильности, что приводит к существенному улучшению стабильности сконструированных белковых конструкций, содержащих домен Fc.

В тексте описания данного изобретения и в нижеприведенной формуле изобретения, если из контекста не следует иное, слово «содержать» и его вариации, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа, этапа или группы целых чисел, или группы этапов, но не исключение любого другого целого числа, этапа или группы целых чисел, или групп этапов.

Все патенты, заявки на патенты и ссылки, указанные в тексте описания данного изобретения, включены в данное описание посредством ссылки во всей полноте.

Данное изобретение охватывает собой все комбинации предпочтительных и более предпочтительных групп, и подходящих и более подходящих групп, и вариантов осуществления групп, перечисленных выше.

Формула изобретения

1. Композиция в виде водного раствора, имеющая рН в диапазоне от около 4,0 до около 8,5, содержащая:

- сконструированную белковую конструкцию, содержащую домен Fc;
- необязательно – один или более буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с показателем рK_a в диапазоне от около 3,0 до около 9,5, и при этом рK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции;
- необязательно – одну или более нейтральных аминокислот; и
- незаряженный модификатор тоничности;

при этом буферы присутствуют в композиции в общей концентрации в диапазоне от около 0 мМ до около 10 мМ; и при этом общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 20 мМ.

2. Композиция в виде водного раствора по п. 1, отличающаяся тем, что буферы присутствуют в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 мМ до около 5 мМ, например, от около 0,1 мМ до около 4 мМ, от около 0,1 мМ до около 3 мМ или от около 0,1 мМ до около 2 мМ, или от около 0,1 мМ до около 1 мМ.

3. Композиция в виде водного раствора по п. 1, отличающаяся тем, что буферы присутствуют в общей концентрации в диапазоне от около 1 мМ до около 5 мМ, например, от около 1 мМ до около 4 мМ или от около 1 мМ до около 3 мМ.

4. Композиция в виде водного раствора по п. 1, отличающаяся тем, что буферы присутствуют в общей концентрации, которая составляет <4,5 мМ, например, <4 мМ, <3 мМ, <2 мМ, <1 мМ, <0,5 мМ, <0,4 мМ, <0,3 мМ, <0,2 мМ или <0,1 мМ.

5. Композиция в виде водного раствора по п. 1, по существу не содержащая буферы.

6. Композиция в виде водного раствора по п. 1, отличающаяся тем, что буферы присутствуют в общей концентрации в диапазоне от около 5 мМ до около 10 мМ, например, от около 5,5 мМ до около 10 мМ, от около 6 мМ до около 10 мМ, от около 6,5 мМ до около 10 мМ, от около 7 мМ до около 10 мМ, от около 7,5 мМ до около 10 мМ, от около 8 мМ до около 10 мМ, от около 8,5 мМ до около 10 мМ или от около 9 мМ до около 10 мМ.

7. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что буфер содержит ионизируемые группы с рK_a в диапазоне 1 единицы рН от рН композиции.

8. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-4, 6 или 7, отличающаяся тем, что буфер или буферы выбран/выбраны из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, сульфита, глиоксилата, аспартама, глюкуроната, аспартата, глутамата, тартрата, глюконата, лактата, гликолевой кислоты, аденина, сукцината, аскорбата, бензоата,

фенилацетата, галлата, цитозина, *p*-аминобензойной кислоты, сорбата, ацетата, пропионата, альгината, урата, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновой кислоты, бикарбоната, бис(2-гидроксиэтил) иминоtris(гидроксиметил)метана, *N*-(2-ацетамидо)-2-иминодиуксусной кислоты, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновой кислоты, пиперазина, *N,N'*-бис(2-этансульфоновой кислоты), фосфата, *N,N*--бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты, 3-[*N,N*-бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновой кислоты, триэтанолamina, пиперазин-*N,N'*-бис(2-гидроксипропансульфоновой кислоты), трис(гидроксиметил)аминометана, *N*-трис(гидроксиметил)глицина и *N*-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновой кислоты, и их солей, и их комбинаций.

9. Композиция в виде водного раствора по п. 8, отличающаяся тем, что буфер выбран из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, тартрата, лактата, бензоата, ацетата, бикарбоната, фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана, например, выбран из группы, состоящей из цитрата и фосфата.

10. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что осмолярность композиции составляет от около 200 мОсм/л до около 600 мОсм/л, например, от около 200 мОсм/л до около 500 мОсм/л, от около 200 мОсм/л до около 400 мОсм/л или от около 300 мОсм/л.

11. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-10, содержащая полиол в качестве незаряженного модификатора тоничности.

12. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-10, содержащая незаряженный модификатор тоничности, выбранный из глицерола, 1,2-пропандиола, маннита, сорбита, сахарозы, трегалозы, ПЭГ300 и ПЭГ400, и, в частности, выбранный из глицерола, маннита, 1,2-пропандиола и сахарозы.

13. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что общая концентрация незаряженного модификатора тоничности составляет 50-1000 мМ, например, 200-500 мМ или около 300 мМ.

14. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-13, содержащая одну или более нейтральных аминокислот, выбранных из глицина, метионина, пролина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, серина, треонина, аспарагина, глутамина.

15. Композиция в виде водного раствора по п. 15, содержащая одну или более нейтральных аминокислот, выбранных из глицина, метионина, пролина и аланина.

16. Композиция в виде водного раствора по п. 15, содержащая пролин в качестве нейтральной аминокислоты.

17. Композиция в виде водного раствора по п. 15, содержащая глицин в качестве нейтральной аминокислоты.
18. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что общая концентрация одной или более нейтральных аминокислот в композиции составляет от 20 до 200 мМ, например, 50-150 мМ.
19. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что общая ионная сила композиции без учета вклада сконструированной белковой конструкции составляет меньше чем 10 мМ.
20. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-19, отличающаяся тем, что рН находится в диапазоне от около 4,0 до около 7,5, например, от около 5,0 до около 7,5, например, от около 5,5 до около 7,5, например, от около 6,0 до около 7,5, например, от около 7,0 до около 7,5.
21. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что сконструированная белковая конструкция представляет собой слияние домена Fc с гетерологичным полипептидом.
22. Композиция в виде водного раствора по п. 21, отличающаяся тем, что гетерологичный полипептид выбран из цитокинов, факторов роста, факторов свертывания крови, ферментов, рецепторных белков, агонистов GLP-1 и их функциональных фрагментов и доменов.
23. Композиция в виде водного раствора по п. 22, отличающаяся тем, что сконструированная белковая конструкция выбрана из этанерцепта, абатацепта, белатацепта, афлиберцепта, рилонацепта, ромиплостима, элоктата, луспATERцепта, дулаглутида и алпроликса.
24. Композиция в виде водного раствора по п. 22, отличающаяся тем, что гетерологичный полипептид представляет собой ингибитор протеазы.
25. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что сконструированная белковая конструкция представляет собой биспецифическое антитело в формате 4-цепочечного антитела, имеющее две разные переменные области связывания.
26. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что сконструированная белковая конструкция представляет собой биспецифическое антитело в формате 2-цепочечного антитела, имеющее две разные переменные области связывания.
27. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что домен Fc представляет собой домен Fc из IgG, такого как IgG1.

28. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-20 или 27, отличающаяся тем, что сконструированная белковая конструкция содержит домен Fc IgG и два или более переменных доменов цепей иммуноглобулинов.
29. Композиция в виде водного раствора по п. 28, отличающаяся тем, что сконструированная белковая конструкция содержит домен Fc IgG, образованный из двух цепей, каждая из которых напрямую связана с одним или более (например, с одним или двумя) переменными доменами цепей иммуноглобулинов.
30. Композиция в виде водного раствора по п. 28, отличающаяся тем, что сконструированная белковая конструкция содержит домен Fc IgG, образованный из двух цепей, каждая из которых непрямо связана с одним или более (например, с одним или двумя) переменными доменами цепей иммуноглобулинов.
31. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 28-30, отличающаяся тем, что каждый из переменных доменов цепей иммуноглобулинов обладает одной и той же специфичностью.
32. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 28-30, отличающаяся тем, что каждый из переменных доменов цепей иммуноглобулинов имеет две или более (например, одну или две) разные специфичности.
33. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 28-32, отличающаяся тем, что переменные домены цепей иммуноглобулинов представляют собой домены V_{HH} .
34. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 28-32, отличающаяся тем, что переменные домены цепей иммуноглобулинов представляют собой домены V_H .
35. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 28-32, отличающаяся тем, что переменные домены цепей иммуноглобулинов представляют собой домены V_L .
36. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-35, отличающаяся тем, что белок присутствует в концентрации от 1 до 400 мг/мл, например, 10-200 мг/мл, например, 20-100 мг/мл.
37. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-36, которая содержит неионогенный сурфактант.
38. Композиция в виде водного раствора по п. 37, отличающаяся тем, что неионогенный сурфактант выбран из группы, состоящей из алкилгликозида, полисорбата, алкилового эфира полиэтиленгликоля, блок-сополимера полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, и алкилфенилового эфира полиэтиленгликоля.
39. Композиция в виде водного раствора по п. 37, отличающаяся тем, что неионогенный сурфактант представляет собой полисорбат, такой как полисорбат 20 или полисорбат 80.

40. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 37-39, отличающаяся тем, что неионогенный сурфактант присутствует в концентрации 10-2000 мкг/мл, например, 50-1000 мкг/мл, 100-500 мкг/мл или около 200 мкг/мл.
41. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-40, которая содержит консервант, такой как фенольный или бензиловый консервант.
42. Композиция в виде водного раствора по п. 41, отличающаяся тем, что фенольный или бензиловый консервант выбран из группы, состоящей из фенола, m-крезола, хлорокрезола, бензилового спирта, пропилпарабена и метилпарабена.
43. Композиция в виде водного раствора по п. 41 или п. 42, отличающаяся тем, что консервант присутствует в концентрации 10-100 мМ, например, 20-80 мМ или 25-50 мМ.
44. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-43, которая представляет собой композицию для применения в терапии.
45. Композиция в виде водного раствора по любому из пп. 1-44, которая представляет собой фармацевтическую композицию.