

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046994**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.21</p> <p>(21) Номер заявки
202190335</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2019.07.19</p> | <p>(51) Int. Cl. A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

(54) **КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FcRn И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(31) 62/701,467</p> <p>(32) 2018.07.20</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2021.06.11</p> <p>(86) PCT/US2019/042597</p> <p>(87) WO 2020/023310 2020.01.30</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МОМЕНТА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Уильям Ева, Сингх Нариндер, Патил
Сиддхеш, Чжан Чжунли, Ст.Луис
Грегори (US)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) US-A1-20180016334
US-A1-20110027262
(MONTES, T et al.) Genetic Modification of the Penicillin G Acylase Surface To Improve Its Reversible Immobilization on Ionic Exchangers. Applied and Environmental Microbiology. January 2007, Epub 10 November 2006, Vol. 73, No. 1; pages 312-319; DOI: 10.1128/AEM.02107-06
(WHITTAKER, MM et al.) Burst Kinetics and Redox Transformations of the Active Site Manganese Ion in Oxalate Oxidase: Implications for the Catalytic Mechanism. The Journal of Biological Chemistry. 9 March 2007, Epub 8 January 2007, Vol. 282, No. 10; pages 7011-7023; page 7011, 1st column, 1st paragraph; page 7012, 2nd column, 3rd paragraph; DOI: 10.1074/jbc.M609374200
(CHRISTENSEN, D et al.) Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. Biochimica et Biophysica Acta. September 2007, Epub 13 May 2007, Vol. 1768, No. 9; pages 2120-2129; DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.05.009
US-A1-20150329628
US-A1-20150157709
US-A1-20090131639</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

- (57) Изобретение относится к стабильным фармацевтическим композициям, содержащим антитело против FcRn1, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, фосфат натрия, хлорид натрия, трегалозу и полисорбат 80, забуференный при pH 6,5. Фармацевтическая композиция может использоваться для лечения аутоиммунных заболеваний.

B1**046994****046994 B1**

Уровень техники

Многочисленные аутоиммунные и аллоиммунные заболевания опосредованы патогенными антителами. Стабильность, активность и транспорт патогенных антител зависит от неонатального Fc-рецептора (FcRn), трансмембранного белка типа I, функционирующего в качестве связывающего IgG и сывороточный альбумин внутриклеточного белка везикулярного транспорта. Например, многие фетальные и неонатальные иммунологические заболевания являются результатом переноса материнских антител от беременной женщины, в частности, беременной женщины с иммунологическим заболеванием, в плод с помощью неонатального Fc-рецептора (FcRn) человека в плаценте.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело против FcRn (композициям M281), и способам применения таких композиций в лечении аутоиммунных заболеваний.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей: антитело, включающее тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 с до 5 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с до 5 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот, в количестве 10 или 30 мг/мл, 20-30 мМ фосфата натрия, 20-30 мМ хлорида натрия, 80-100 (например, 90-91) мг/мл трегалозы и 0,1-0,005% мас./об. полисорбата 80, забуференной при pH 6,5.

В различных случаях композиция: включает 25 мМ фосфата натрия; включает 25 мМ хлорида натрия; включает 90-91 мг/мл трегалозы; включает 90,5 мг/мл трегалозы; включает 0,01% мас./об. полисорбата 80; включает 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг/мл трегалозы и 0,01% полисорбата 80; композиция не содержит какие-либо дополнительные эксципиенты; композиция не включает какие-либо иные полисорбаты, чем полисорбат 80, композиция не включает какие-либо иные полимеры, чем полисорбат, композиция не включает какие-либо иные полимеры, чем полисорбат 80, антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 с до 2 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с до 2 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот; антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 с до 2 замен отдельных аминокислот, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с до 2 замен отдельных аминокислот; антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей: антитело, включающее тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 с до 5 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 с до 5 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот, в количестве 10 или 30 мг/мл, 20-30 мМ сукцината натрия, 20-30 мМ хлорида натрия, 89-92 мг/мл трегалозы и 0,02-0,005% мас./об. полисорбата 80, забуференной при pH 6,5.

В различных случаях композиция: включает 25 мМ сукцината натрия; включает 25 мМ хлорида натрия; включает 90-91 мг/мл трегалозы; включает 90,5 мг/мл трегалозы; включает 0,01% мас./об. полисорбата 80; включает 25 мМ сукцината натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг/мл трегалозы и 0,01% полисорбата 80; композиция не содержит какие-либо дополнительные эксципиенты; антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 с до 2 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с до 2 инсерций, замен или делеций отдельных аминокислот; антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 с до 2 замен отдельных аминокислот, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 с до 2 замен отдельных аминокислот; антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают значением, общепринятым понятным специалисту в области, к которой принадлежит изобретение. Способы и материалы представлены в настоящем описании для использования в настоящем изобретении, а также можно использовать другие подходящие способы и материалы, известные в этой области. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, записи в базах данных и другие ссылки, упомянутые в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки в полном объеме. В случае противоречия, настоящее описание, включая определения, будет обладать приоритетом.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и фигур, а также формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны данные о термических переходах, измеряемых посредством DSC, для составов в табл. 1.

На фиг. 2 показаны данные о чистоте по размеру, измеряемой посредством SEC в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 1.

На фиг. 3 показаны данные о гетерогенности заряда, измеряемой посредством cIEF в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 1.

На фиг. 4 показаны данные о чистоте, измеряемой посредством CE-SDS Caliper (невосстановительные условия) в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 1.

На фиг. 5 показаны данные о чистоте, измеряемой посредством CE-SDS Caliper (восстановительные условия) в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 1.

На фиг. 6 показаны данные о чистоте по размеру, измеряемой посредством SEC в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 2.

На фиг. 7 показаны данные о гетерогенности заряда, измеряемой посредством cIEF в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 2.

На фиг. 8 показаны данные о распределении по размеру, измеряемого посредством динамического светорассеяния (DLS) для составов в табл. 2.

На фиг. 9 показаны данные о чистоте, измеряемой посредством CE-SDS Caliper (невосстановительные условия) в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 2.

На фиг. 10 показаны данные о чистоте, измеряемой посредством CE-SDS Caliper (восстановительные условия) в условиях ускоренных испытаний, для составов в табл. 2.

На фиг. 11 показаны данные о термических переходах, измеряемых посредством DSC с буферами с различным pH, для составов в табл. 2. Более высокая T_m начала свидетельствует о лучшей термической стабильности белка при конкретном pH. В скрининговом исследовании pH определяли три перехода, T_{m1} , T_{m2} и T_{m3} .

На фиг. 12 показано сравнение % уровня главных видов антитела по результатам cIEF при температурном стрессе. Результаты исследования стабильности антитела в условиях длительного хранения при 2-8°C показаны в виде сплошной линии, и результаты исследования хранения в условиях ускоренного старения при 25°C/60% RH показаны в виде пунктирной линии. Антитело при 30 мг/мл в случае партии D показано красным цветом. Антитело при 10 мг/мл в случае партии E показано черным цветом, в случае партии F показано фиолетовым цветом, и в случае партии B показано синим цветом. Примечание: зеленая техническая линия относится только к условиям в реальном времени при 2-8°C.

На фиг. 13 показано сравнение антитело % уровня главных видов антитела по результатам SEC-ВЭЖХ при температурном стрессе. Результаты исследования стабильности антитела в условиях длительного хранения при 2-8°C показаны в виде сплошной линии, и результаты исследования хранения в условиях ускоренного старения при 25°C/60% RH показаны в виде пунктирной линии. Антитело при 30 мг/мл в случае партии D показано красным цветом. Антитело при 10 мг/мл в случае партии E показано черным цветом, в случае партии F показано фиолетовым цветом, и в случае партии B показано синим цветом. Зеленая техническая линия относится только к условиям в реальном времени при 2-8°C.

На фиг. 14A-14D показаны данные о концентрации белка в опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, в партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B GMP через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех из партий DP 10 мг/мл (B); концентрация 30 мг/мл в опытной партии DP D через 12 месяцев и партии C GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (C), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). USL: верхний предел спецификации; LSL: нижний предел спецификации.

На фиг. 15A-15D показан pH опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); pH опытной партии D DP через 12 месяцев и партии C GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (C), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). USL: верхний предел спецификации; LSL: нижний предел спецификации.

На фиг. 16A-16D показаны данные о чистоте по размеру опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); Чистота по размеру по результатам SEC опытной партии D DP через 12 месяцев и партии C GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (C), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). LSL: нижний предел спецификации.

На фиг. 17A-17D показаны данные для чистоты по результатам CE-SDS в восстановительных условиях для опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); чистота HC+LC по результатам CE-SDS в восстановительных условиях опытной партии D DP через 12 месяцев и

партии С GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (С), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). LSL: нижний предел спецификации.

На фиг. 18A-18D показаны данные о чистоте по размеру по результатам CE-SDS в невосстановительных условиях опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); чистота по размеру по результатам CE-SDS в невосстановительных условиях опытной партии D DP через 12 месяцев и партии С GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (С), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). LSL: нижний предел спецификации.

На фиг. 19A-D показаны данные об уровне пика А по результатам CE-SDS в невосстановительных условиях опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); уровни пика А по результатам CE-SDS в невосстановительных условиях опытной партии D DP через 12 месяцев и партии С GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (С), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). USL: верхний предел спецификации.

На фиг. 20A-D показаны данные об основном пике по результатам cIEF опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); основной пик по результатам cIEF опытной партии D DP через 12 месяцев и партии С GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (С), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). LSL: нижний предел спецификации.

На фиг. 21A-21D показаны данные о кислом пике по результатам cIEF опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); кислый пик по результатам cIEF опытной партии D DP через 12 месяцев и партии С GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (С), и строили график регрессии для исследования для партии D DP (D). USL: верхний предел спецификации.

На фиг. 22A-22D показаны данные об основном пике по результатам cIEF опытной партии E DP 10 мг/мл через 30 месяцев, партии F через 24 месяца, партии A GMP через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для всех партий DP 10 мг/мл (B); основной пик по результатам cIEF опытной партии D DP через 12 месяцев и партии С GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (С), и строили график регрессии для исследования (D). USL: верхний предел спецификации.

На фиг. 23A-23D показаны данные об активности партии A DP GMP 10 мг/мл через 24 месяца, партии B через 18 месяцев (A) в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности, и строили график регрессии для исследования для обеих партий DP 10 мг/мл (B); активность опытной партии D DP через 12 месяцев и партии С GMP через 3 месяца в условиях длительного хранения при 2-8°C в исследовании стабильности (С), и строили график регрессии для исследования (D). USL: верхний предел спецификации; LSL: нижний предел спецификации.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитела против неонатального рецептора Fc человека (FcRn). Эти композиции можно использовать, например, для стимуляции клиренса аутоантител у индивидуума, для супрессии презентирования антигена у индивидуума, для блокирования иммунного ответа, например, блокирования основанной на иммунных комплексах активации иммунного ответа у индивидуума или для лечения иммунологических заболеваний (например, аутоиммунных заболеваний) у индивидуума.

После исходных исследований получали выбранные составы с разными концентрациями хлорида натрия, трегалозы и поверхностно-активного вещества полисорбата (PS) 80, буферных средств и забуферивали их при разном pH (pH 5-8). Таким образом, композиции включают ионный стабилизатор-осмолит (хлорид натрия) и неионный стабилизатор-осмолит (трегалозу). Стабильность указанных выше составов оценивали с течением времени по внешнему виду, pH, концентрации белка, чистоте по размеру, распределению заряда и термической стабильности. Эти параметры измеряли аналитическими способами, включая pH, УФ-спектроскопию, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, CE-SDS и дифференциальную сканирующую калориметрию.

Два состава демонстрировали повышенную стабильность, что оценивали по указанным выше пара-

метрам, и стабильность сохранялась с течением времени: (1) 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг мл⁻¹ трегалозы, 0,01% полисорбата (PS) 80 и антитело (содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 1) в количестве 10 или 30 мг мл⁻¹, забуференные при pH 6,5; и (2) 25 мМ сукцината натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг мл⁻¹ трегалозы, 0,01% полисорбата (PS) 80, и антитело (содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 1) в количестве 10 или 30 мг мл⁻¹, забуференные при pH 6,6. Стабильность указанных выше двух составов далее тестировали в присутствии выбранного механического, термического и химического стресса. Оба состава не демонстрировали значительного ухудшения стабильности, оцениваемой по многочисленным указанным выше параметрам с течением времени. Примечательно, что стабильность сохраняли в течение более чем 30 месяцев в случае состава (1) 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг мл⁻¹ трегалозы, 0,01% полисорбата (PS) 80 и антитело в количестве 10 или 30 мг мл⁻¹, забуференные при pH 6,5. Также тестировали состав, представляющий собой 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг мл⁻¹ трегалозы и антитело (содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 1), забуференные при pH 6,5, с разными количествами полисорбата 80.

Антитела против FcRn.

Антитела, которые можно составлять, как представлено в настоящем описании, включают антитело, имеющее последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 1 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 2 (также обозначаемое как M281); композиции, содержащие это антитело иногда обозначают как композиции M281. Варианты этого антитела также можно составлять, как представлено в настоящем описании. Такие варианты включают: антитело, имеющее последовательность легкой цепи варианта SEQ ID NO: 1, имеющего 1-5 замен или делеций отдельных аминокислот (и, предпочтительно, содержащего последовательности CDR SEQ ID NO: 3-5), и последовательность тяжелой цепи варианта SEQ ID NO: 2, имеющего 1-5 замен или делеций отдельных аминокислот (и, предпочтительно, содержащего последовательности CDR SEQ ID NO: 6-8). Антитела, состоящие из варианта SEQ ID NO: 1 и варианта SEQ ID NO: 2, предпочтительно, сохраняют последовательности CDR: TGTGSDVGSYNLVS (CDR1 легкой цепи; SEQ ID NO: 3); GDSERPS (CDR2 легкой цепи; SEQ ID NO: 4); SSYAGSGIYV (CDR3 легкой цепи; SEQ ID NO: 5); TYAMG (CDR1 тяжелой цепи; SEQ ID NO: 6); SIGASGSQTRYADS (CDR2 тяжелой цепи; SEQ ID NO: 7) и LAIGDSY (CDR3 тяжелой цепи; SEQ ID NO: 8).

В некоторых случаях легкая цепь имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности в отношении:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGSYNLWSYQHPGKAPKLMYGDSE
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYAGSGIYVFGTGKVTVLGQPKA
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSN
KYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 1).

В некоторых случаях тяжелая цепь имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности в отношении:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIGAS
GSQTRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLAIGDSYWGQGTM
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 2).

Векторы, клетки-хозяева и получение антитела.

Антитела против FcRn можно получать из клетки-хозяина. Термин "клетка-хозяин" относится к носителю, включающему необходимые клеточные компоненты, например, органеллы, необходимые для экспрессии полипептидов и конструкций, представленных в настоящем описании, с их соответствующих нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты можно включать в векторы нуклеиновой кислоты, которые можно встраивать в клетку-хозяина общепринятыми способами, известными в этой области (например, посредством трансформации, трансфекции, электропорации, осаждения фосфатом кальция, прямой микроинъекции, инфекции и т.д.). Выбор векторов нуклеиновой кислоты частично зависит от клеток-хозяев, подлежащих использованию. Как правило, предпочтительные клетки-хозяева имеют прокариотическое (например, бактерии) или эукариотическое (например, клетки млекопитающих) происхождение.

Конструкции вектора нуклеиновой кислоты и клетки-хозяева.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность антитела против FcRn, можно получать различными известными в этой области способами. Эти способы включают, в качестве неограничивающих примеров, олигонуклеотид-опосредованный (или сайт-специфический) мутагенез и ПЦР-мутагенез. Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против FcRn, можно получать стандартными способами, например, посредством синтеза гена. Альтерна-

тивно, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против FcRn дикого типа, можно подвергать мутагенезу так, чтобы она содержала конкретные замены аминокислот, стандартными способами, известными в этой области, например, мутагенезу QuikChange™. Молекулы нуклеиновой кислоты можно синтезировать с использованием нуклеотидного синтезатора или способов ПЦР.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело против FcRn, можно встраивать в вектор, способный реплицироваться и экспрессировать молекулы нуклеиновой кислоты в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах. В этой области доступно множество векторов, и их можно использовать. Каждый вектор может содержать различные компоненты, которые можно корректировать и оптимизировать для совместимости с конкретной клеткой-хозяином. Например, компоненты вектора могут включать, в качестве неограничивающих примеров, участок начала репликации, ген селективного маркера, промотор, участок связывания рибосомы, сигнальную последовательность, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую интересующий белок, и последовательность терминации транскрипции.

В качестве клеток-хозяев можно использовать клетки млекопитающих. Примеры типов клеток млекопитающих включают, в качестве неограничивающих примеров, эмбриональные клетки почки человека (HEK) (например, HEK293, HEK293F), клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NSO, Sp2/0, VERY, BHK, MDCK, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NSO (линию клеток миеломы мыши, непродуцирующих эндогенно какие-либо цепи иммуноглобулинов), CRL7030 и HsS78Bst. В других случаях в качестве клеток-хозяев можно использовать клетки *E.coli*. Неограничивающие примеры штаммов *E.coli* включают *E.coli* 294(ATCC® 31,446), *E.coli* λ 1776(ATCC® 31,537), *E.coli* BL21 (DE3)(ATCC® BAA-1025) и *E.coli* RV308(ATCC® 31,608). Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белковых продуктов. Подходящие линии клеток или системы хозяев можно выбирать для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого антитела против FcRn. Описанные выше экспрессирующие векторы можно встраивать в подходящие клетки-хозяева общепринятыми способами, известными в этой области, например, посредством трансформации, трансфекции, электропорации, осаждения фосфатом кальция и прямой микроинъекции. После встраивания векторов в клетки-хозяева для продукции белка клетки-хозяева культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных, при необходимости, для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. Способы экспрессии терапевтических белков известны в этой области, см., например, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular biology)*, Humana Press; 2nd ed. 2004 (July 20, 2004) и Vladimir Voynov and Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular biology)* Humana Press; 2nd ed. 2012 (June 28, 2012).

Производство белка, выделение и очистка.

Клетки-хозяева, используемые для получения антитела против FcRn, можно выращивать в средах, известных в этой области и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред для клеток-хозяев млекопитающих включают минимальную питательную среду (MEM), модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), экспрессионную среду Expi293™, DMEM, дополненную эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), и RPMI-1640. Примеры подходящих сред для бактериальных клеток-хозяев включают бульон Луриа (LB) с необходимыми добавками, такими как средство для селекции, например, ампициллин. Клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах, например, от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C, например, от 25°C до приблизительно 37°C, предпочтительно 37°C, и уровнях CO₂, например, от 5 до 10% (предпочтительно, 8%). pH среды составляет, как правило, приблизительно от 6,8 до 7,4, например, 7,0, в зависимости, в основном, от организма-хозяина. Если в экспрессирующем векторе используют индуцибельный промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора.

Выделение белка, как правило, включает разрушение клетки-хозяина, как правило, посредством осмотического шока, обработки ультразвуком или лизиса. После разрушения клеток, клеточный детрит можно удалять посредством центрифугирования или фильтрации. Белки можно очищать дополнительно. Антитело против FcRn можно очищать любым известным в этой области способом очистки белков, например, посредством аффинной хроматографии с протеином А, другого способа хроматографии (например, ионообменной, аффинной и эксклюзионной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любым другим стандартным способом очистки белков (см. *Process Scale Purification of Antibodies*, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009). В некоторых случаях антитело против FcRn можно конъюгировать с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. Примером маркерной аминокислотной последовательности является гекса-гистидиновый пептид (His-метка), связывающийся с функционализированной никелем агарозной аффинной колонкой с микромолярной аффинностью. Другие пептидные метки, которые можно использовать для очистки, включают, в качестве неограничивающих примеров, гемагглютининовую метку ("НА"), соответствующую эпитопу, полученную из белка гемагглютинина вируса гриппа.

Способы лечения и показания.

Блокирование FcRn человека с помощью фармацевтических композиций, содержащих антитела против FcRn, представленные в настоящем описании, могут приносить терапевтическую пользу при заболеваниях, запускаемых аутоантителами IgG. Способность блокады FcRn индуцировать общий катаболизм IgG и удаление множества видов аутоантител, небольших циркулирующих метаболитов или липопротеинов, позволяет получать способ расширения применимости и доступности стратегии удаления аутоантител для пациентов с запускаемой аутоантителами аутоиммунной патологии. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что доминантным механизмом действия антитела против FcRn может являться повышение катаболизма патогенных аутоантител в кровотоке и снижение накопления аутоантител и иммунных комплексов в пораженных тканях.

Фармацевтические композиции можно использовать для стимуляции катаболизма и клиренса патогенных антител, например, аутоантител IgG и IgG у индивидуума, для снижения иммунного ответа, например, для блокирования основанной на иммунных комплексах активации иммунного ответа у индивидуума, и для лечения иммунологических состояний или заболеваний у индивидуума. В частности, фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения основанной на иммунных комплексах активации острого или хронического иммунного ответа. Острый иммунный ответ может активироваться заболеванием, выбранным из группы, состоящей из обыкновенной пузырчатки, волчаночного нефрита, миастении гравис, синдрома Гийена-Барре, антитело-опосредованного отторжения, катастрофического антифосфолипидного синдрома, опосредованного иммунными комплексами васкулита, гломерулита, каналопатии, оптикомиелита, аутоиммунной потери слуха, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ITP), аутоиммунной гемолитической анемии (АНА), иммунной нейтропении, дилатационной кардиомиопатии и сывороточной болезни. Хронический иммунный ответ может активироваться заболеванием, выбранным из группы, состоящей из хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), системной красной волчанки, хронической формы нарушения, являющегося показанием для неотложного лечения, реактивных артропатий, первичного билиарного цирроза, язвенного колита и ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулита.

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого аутоиммунным заболеванием. Аутоиммунное заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из гнездной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, болезни Аддисона, гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, гепатита, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, дерматита при целиакии, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, синдрома Чарга-Стросса, рубцующегося пемфигоида, ограниченной склеродермии (синдрома CREST), болезни Холодовых агглютининов, болезни Крона, дерматомиозита, дискоидной волчанки, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии, фибромиозита, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, гипотиреоза, воспалительного заболевания кишечника, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, идиопатического легочного фиброза, IgA-нефропатии, инсулинзависимого диабета, ювенильного артрита, красного плоского лишая, системной красной волчанки, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, рассеянного склероза, пернициозной анемии, нодозного полиартериита, полихондрита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, полимиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза, псориаза, болезни Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома мышечной скованности, болезни Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, витилиго, ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулита, миастении гравис, оптикомиелита или гранулематоза Вегенера.

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения риска развития анемии у плода. В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или устранения потребности в IUT (внутриутробном переливании крови). В некоторых случаях фармацевтические композиции и способы можно использовать для снижения или устранения потребности в антенатальном PP+IVIg, постнатальном переливании крови, IVIg и/или фототерапии.

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа у плода или новорожденного. В некоторых случаях фармацевтические композиции и способы можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа у плода или новорожденного, активируемого аутоиммунным заболеванием у беременной женщины.

В частности, фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого при системной красной волчанке, антифосфолипидном синдроме, обыкновенной пузырчатке/буллезном пемфигоиде, ассоциированном с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулите, миастении гравис или оптикомиелите. В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа у плода или новорожденного. В некоторых случаях фармацевтические композиции и способы можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого при системной красной волчанке, антифосфолипидном синдроме, обыкновенной пузырчатке/буллезном пемфигоиде, ассоциированном с антителами к цитоплазме

нейтрофилов (ANCA) васкулите, миастении гравис или оптикомиелите у беременной матери.

Фармацевтические композиции можно использовать в способах снижения транспорта патогенных антител (например, транспорта материнских патогенных антител IgG) через плаценту беременной женщины, повышения катаболизма патогенных антител у беременной женщины и лечения антителоопосредованного усиления вирусного заболевания у плода или новорожденного посредством введения беременной женщине выделенного антитела, связывающегося с FcRn человека. Заболевания и нарушения, при которых можно получить пользу от ингибирования FcRn фармацевтическими композициями, представленными в настоящем описании, включают заболевания и нарушения у плода и/или новорожденного, вызванные переносом материнских патогенных антител (например, материнских патогенных антител IgG) через плаценту от беременной женщины плоду и/или новорожденному.

В некоторых случаях заболевания и нарушения, при которых можно получить пользу от лечения фармацевтическими композициями, представленными в настоящем описании, являются фетальными и неонатальными аллоиммунными и/или аутоиммунными нарушениями. Фетальные и неонатальные аллоиммунные нарушения являются нарушениями плода и/или новорожденного, вызванными патогенными антителами у беременной женщины. Патогенные антитела у беременной женщины могут атаковать антигены плода (например, антигены, которые плод наследует от отца), что вызывает развитие у плода или новорожденного фетального и неонатального аллоиммунного и/или аутоиммунного нарушения.

Примеры фетальных и неонатальных аллоиммунных и/или аутоиммунных нарушений, которые можно подвергать лечению, включают, в качестве неограничивающих примеров, фетальную и неонатальную аллоиммунную тромбоцитопению (FNAIT), гемолитическую болезнь плода и новорожденного (HDFN), аллоиммунную пан-тромбоцитопению, врожденную блокаду сердца, фетальный артрогрипоз, неонатальную миастению гравис, неонатальную аутоиммунную гемолитическую анемию, неонатальный антифосфолипидный синдром, неонатальный полимиозит, дерматомиозит, неонатальную системную красную волчанку, неонатальную склеродермию, болезнь Бехчета, неонатальную болезнь Грейвса, неонатальную болезнь Кавасаки, неонатальное аутоиммунное заболевание щитовидной железы и неонатальный сахарный диабет I типа.

В некоторых случаях заболевания и нарушения, при которых можно получить пользу от лечения фармацевтическими композициями, представленными в настоящем описании, являются вирусными заболеваниями, где антитела облегчают проникновение вируса в клетки-хозяева, что приводит к повышенной или усиленной инфективности в отношении клеток, например, антителоопосредованному усилению вирусного заболевания. В некоторых случаях антитело может связываться с вирусным поверхностным белком, и комплекс антитело/вирус может связываться с FcRn на поверхности клетки посредством взаимодействия между антителом и рецептором. Затем комплекс антитело/вирус может интернализироваться в клетку. Например, вирус может проникать в клетки и/или ткани плода посредством образования комплекса с материнским антителом IgG. Материнское антитело IgG может связываться с вирусным поверхностным белком, и комплекс IgG/вирус может связываться с FcRn в синцитиотрофобластах плаценты, который затем переносит комплекс в плод.

В некоторых случаях фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения антителоопосредованного усиления вирусного заболевания. В некоторых случаях вирусные заболевания, усиливаемые патогенными антителами (например, патогенными антителами IgG), включают, в качестве неограничивающих примеров, вирусные заболевания, вызываемые инфекцией альфа-вирусов, инфекцией флавивирусов, инфекцией вируса Зика, инфекцией вируса чикунгунья, инфекцией вируса реки Росс, инфекцией коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома, ближневосточным респираторным синдромом, инфекцией птичьего гриппа, инфекцией вируса гриппа, инфекцией респираторно-синцитиального вируса человека, инфекцией вируса Эбола, инфекцией вируса желтой лихорадки, инфекцией вируса денге, инфекцией вируса иммунодефицита человека, инфекцией респираторно-синцитиального вируса, инфекцией хантавируса, инфекцией вируса Гета, инфекцией вируса Синдбис, инфекцией вирусов Буньямвера, инфекцией вируса лихорадки Западного Нила, инфекцией вируса японского энцефалита В, инфекцией вируса оспы кроликов, инфекцией вируса, повышающего лактатдегидрогеназу, инфекцией реовирусов, инфекцией вируса бешенства, инфекцией вируса ящура, инфекцией вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома, инфекцией вируса геморрагической лихорадки обезьян, инфекцией вируса инфекционной анемии лошадей, инфекцией вируса артрита-энцефалита коз, инфекцией вируса африканской чумы свиней, инфекцией лентивирусов, инфекцией ВК-паповавируса, инфекцией вируса австралийского энцефалита, инфекцией энтеровируса, инфекцией цитомегаловируса, инфекцией пневмовирусов, инфекцией морбилливирусов и инфекцией вируса кори.

Блокирование FcRn человека с помощью антител против FcRn может приносить терапевтическую пользу при заболеваниях, запускаемых патогенными антителами (например, патогенными антителами IgG). Способность блокады FcRn индуцировать общий катаболизм патогенных антител и удаление множества видов патогенных антител без нарушения сывороточного альбумина, небольших циркулирующих метаболитов или липопротеинов позволяет получать способ расширения применимости и доступности стратегии удаления патогенных антител для пациентов с аутоиммунной патологией, запускаемой патогенными антителами. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что доминантным меха-

низмом действия антитела против FcRn может являться повышение катаболизма патогенных антител в кровотоке и снижение накопления патогенных антител и иммунных комплексов в поврежденных тканях.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить беременной женщине, имеющей риск развития заболевания, активирующего иммунный ответ у беременной женщины. В некоторых случаях беременная женщина в прошлом могла иметь заболевание, активирующее иммунный ответ у беременной женщины. В некоторых случаях беременная женщина имеет анамнез, включающий плод или новорожденного, имевшего фетальное и неонатальное аллоиммунное и/или аутоиммунное нарушение. В некоторых случаях антитела против FcRn, представленные в настоящем описании, можно вводить беременной женщине, если патогенное антитело, ассоциированное с иммунным заболеванием, определяют в биологическом образце (например, образце крови или мочи), полученном от беременной женщины. В некоторых случаях известно, что патогенное антитело, определяемое в биологическом образце беременной женщины, связывается с антигеном плода беременной женщины (например, антигеном, который плод наследует от отца).

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно вводить индивидууму, планирующему беременность, и имеющему риск развития заболевания, активирующего иммунный ответ у беременной женщины, и/или имевшему в прошлом заболевание, активирующее иммунный ответ у беременной женщины. В некоторых случаях индивидуум планирует беременность и имеет анамнез, включающий плод или новорожденного, имевшего фетальное и неонатальное аллоиммунное и/или аутоиммунное нарушение. В некоторых случаях антитела FcRn, представленные в настоящем описании, можно вводить индивидууму, планирующему беременность, и биологический образец которого содержит патогенное антитело, ассоциированное с иммунным заболеванием.

В некоторых случаях фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить индивидууму (например, беременной женщине) для снижения или лечения основанной на иммунных комплексах активации острого или хронического иммунного ответа у индивидуума. Острый иммунный ответ может активироваться при заболевании (например, обыкновенной пузырчатке, волчаночном нефрите, миастении гравис, синдроме Гийена-Барре, антитело-опосредованном отторжении, катастрофическом антифосфолипидном синдроме, опосредованном иммунными комплексами васкулите, гломерулите, каналопатии, оптикомиелите, аутоиммунной потере слуха, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, аутоиммунной гемолитической анемии, иммунной нейтропении, дилатационной кардиомиопатии, сывороточной болезни, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, системной красной волчанке, реактивных артропатиях, первичном билиарном циррозе, язвенном колите или ассоциированном с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулите).

В некоторых случаях состав, представленный в настоящем описании, можно вводить индивидууму (например, беременной женщине) для снижения или лечения иммунного ответа, активирующего при аутоиммунном заболевании. Аутоиммунное заболевание может являться, например, гнездой алопецией, анкилозирующим спондилитом, антифосфолипидным синдромом, болезнью Аддисона, гемолитической анемией, аутоиммунной гемолитической анемией с синдромом тепловых агглютининов (wAIHA), антителами против факторов свертывания, гепарин-индуцированной тромбоцитопенией (HIT), сенсибилизированным трансплантатом, аутоиммунным гепатитом, гепатитом, болезнью Бехчета, буллезным пемфигоидом, кардиомиопатией, дерматитом при целиакии, синдромом хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатией, синдромом Чарга-Стросса, рубцующимся пемфигоидом, ограниченной склеродермией (синдромом CREST), болезнью холодовых агглютининов, болезнью Крона, дерматомиозитом, дискоидной волчанкой, первичной криоглобулинемией смешанного типа, фибромиалгией, фибромиозитом, болезнью Грейвса, тиреоидитом Хашимото, гипотиреозом, воспалительным заболеванием кишечника, аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом, идиопатическим легочным фиброзом, IgA-нефропатией, инсулинзависимым диабетом, ювенильным артритом, красным плоским лишаем, системной красной волчанкой, болезнью Меньера, смешанным заболеванием соединительной ткани, рассеянным склерозом, пернициозной анемией, нодозным полиартериитом, полихондритом, полигландулярными синдромами, ревматической полимиалгией, полимиозитом, первичной агаммаглобулинемией, первичным билиарным циррозом, псориазом, болезнью Рейно, синдромом Рейтера, ревматической лихорадкой, ревматоидным артритом, саркоидозом, склеродермией, синдромом Шегрена, синдромом мышечной скованности, болезнью Такаясу, височным артериитом, язвенным колитом, увеитом, витилиго или гранулематозом Вегенера.

Примеры

В примерах, приведенных в настоящем описании, использовали следующие материалы и способы. Материалы.

Материалы, приобретенные у коммерческих поставщиков, включали моногидрат дигидроортофосфата натрия (J.T. Baker), безводный гидроортофосфат натрия (J.T. Baker), янтарную кислоту (TGI), сукцинат натрия (Masgon), хлорид натрия (J.T. Baker), моногидрат лимонной кислоты (AppliChem), соляную кислоту (J.T. Baker), гидроксид натрия (Masgon), дегидрат α -а-трегалозы высокой чистоты (низкий уровень эндотоксина) (Pfanstiehl), сверхочищенный полисорбат 80-LQ (MH) (Croda).

Антитело, используемое в настоящем описании (содержащее тяжелую цепь SEQ ID NO: 2 и легкую

цепь SEQ ID NO: 1) форматировали в виде IgG1 с аллотипом тяжелой цепи G1m17, полностью лямбда-легкой цепью, в которой отсутствует концевой Lys (K446: нумерация EU), но есть мутация Asn297Ala (нумерация EU), устраняющая гликозилирование по Asn297.

Анализ внешнего вида.

Внешний вид всех образцов, включая прозрачность, цвет и видимые частицы, исследовали с использованием черного и белого фона с помощью светового короба (Tianda Tianfa, Model YB-2).

Измерение pH.

pH образца измеряли с использованием pH-метра с электродом Inlab®Micro (Mettler Toledo, Model Seven Multi S40). pH-метр калибровали каждый раз перед использованием с использованием коммерчески доступных калибровочных растворов.

Измерение концентрации белка.

Концентрацию белка определяли посредством считывания УФ при 280 нм с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Коэффициент экстинкции, используемый во всех исследованиях, составлял 1,447 о.е. мл мг⁻¹ см⁻¹.

Способ измерения осмоляльности.

Осмоляльность измеряли с использованием осмометра (Advanced Instruments, Advanced Multi-Sample Osmometer; модель № 2020) без разведения образцов. До и после тестирования точность тестирования осмометра подтверждали с помощью референсного раствора клинического контроля 290 мОсм/кг.

Дифференциальная сканирующая калориметрия.

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) в капиллярной ячейке использовали для измерения термической стабильности белков посредством детекции различий количества тепла, необходимого для повышения температуры образца и референса в качестве функции температуры. В частности, посредством DEC измеряют точку термического перехода (T_m), являющуюся показателем относительной стабильности белка в растворе. В кратком изложении, образцы разводили до приблизительно 1 мг мл⁻¹ с использованием коммерчески доступного референсного буфера. Аликвоту 400 мкл референсного буфера добавляли в каждую нечетную лунку 96-луночного планшета, в то время как аликвоту 400 мкл каждого образца добавляли в соответствующую четную лунку. Температура сканирования находится в диапазоне от 10°C до 100°C при скорости сканирования 200°C в час. Анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения для анализа данных автоматизированной VP-капиллярной DSC MicroCal 2.0.

Эксклюзионная хроматография.

Эксклюзионную хроматографию (SEC) осуществляли с использованием системы Agilent 1260 Infinity с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии TSKGel G3000SWXL (300ЧЧ7,8 мм, 5 мкм) при 25°C. Образцы разводили до 10 мг мл⁻¹ с помощью подвижной фазы до анализа SEC и впрыскивали образец, содержащий 100 мкг белка. Использовали изократический градиент в течение 20 мин при скорости потока 1 мл мин⁻¹. Подвижная фаза состояла из 50 mM буфера фосфата натрия, 300 mM NaCl при pH 7,0±0,2. Данные собирали с помощью УФ-датчика с длиной волны детекции 280 нм и анализировали данные с использованием программного обеспечения Waters Empower.

Капиллярное изоэлектрофокусирование.

Капиллярное изоэлектрофокусирование (cIEF) осуществляли для разделения белков с учетом разницы заряда при градиенте pH с использованием оборудования Protein Simple iCE3 с FC-покрытым картриджем для cIEF. В случае образцов моноклонального антитела (mAb) 20 мкг каждого образца смешивали с 100 мкл мастер-микса, содержащего маркер изоэлектрической точки (pI) 7,55/9,46, сервалит 6-9, сервалит 9-11, раствор метилцеллюлозы. После смешивания образец фокусировали в течение 1 мин при 1500 В и 8 мин при 3000 В. Длина волны детекции составляла 280 нм, и распределение вариантов заряда оценивали в разных диапазонах pI.

Капиллярный электрофорез.

Капиллярный электрофорез (CE-SDS Caliper) осуществляли для разделения покрытых додецилсульфатом белков с учетом размера через фильтрационный полимер с использованием устройства Beckman Coulter PA800 Enhanced или PA800 Plus, оборудованного матричным фотодиодным детектором. При использовании CE-SDS Caliper для измерения образцы в восстановительных условиях разводили до 4 мг мл⁻¹ разбавляющим раствором (PB-CA), а затем нагревали в присутствии 75 мкл буфера для образцов с SDS и 5 мкл 2-меркаптоэтанола при 70°C в течение 10 мин. При использовании CE-SDS Caliper для измерения образцы в невосстановительных условиях разводили до 4 мг мл⁻¹ разбавляющим раствором (PB-CA), а затем нагревали в присутствии 75 мкл буфера для образцов с SDS и 5 мкл 100 mM NEM при 70°C в течение 10 мин. Образцы, полученные в восстановительных или невосстановительных условиях, впрыскивали на катод с обратной полярностью при -5 кВ в течение 20 с с последующим разделением при -15 кВ, и длина волны детекции составляла 220 нм.

Динамическое светорассеяние (DLS).

DLS является способом, которым измеряют степень, с которой свет рассеивается раствором при указанной температуре. Степень рассеяния пропорциональна размеру (в шестой степени) и concentra-

ции (линейно) частиц в растворе. Этот способ используют для мониторинга субмикронных частиц из-за выраженного эффекта размера частиц в отношении светорассеяния. При наименьшем рН (5,0) и наибольшем рН (8,0) наблюдали повышение в распределении по размеру. При всех других рН не наблюдали очевидных различий.

Пример 1. Опытное исследование жидких составов для определения того, как выбрать компоненты состава - типы буферов, рН и эксципенты - влияние на стабильность жидких составов, содержащих антитело.

Получали выбранные составы антитела в настоящем описании (содержащие тяжелую цепь SEQ ID NO: 2 и легкую цепь SEQ ID NO: 1), имеющие концентрацию 30 мг/мл с разными концентрациями фосфата натрия, сукцината натрия, NaCl, трегалозы и PS-80, и измеряли с течением времени и сравнивали свойства составов, например, внешний вид, рН, концентрацию белка, осмоляльность, термическую стабильность, чистоту по размеру, гетерогенность заряда.

Получали выбранные составы, приведенные в табл. 1.

Таблица 1

Компоненты и буферные условия выбранных составов

Состав	рН	Буфер (25 мМ)	Регулятор тоничности, стабилизатор, поверхностно-активное вещество	Концентрация антитела
				мг/мл
F1	7,5	Фосфат натрия	25 мМ NaCl	30
F2	7,5	Фосфат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы	30
F3	7,5	Фосфат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30
F4	7,5	Фосфат натрия	150 мМ NaCl	30
F5	7,5	Фосфат натрия	150 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы	30
F6	7,5	Фосфат натрия	150 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30
F7	7,0	Фосфат натрия	25 мМ NaCl	30
F8	7,0	Фосфат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы	30
F9	7,0	Фосфат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30
F10	7,0	Фосфат натрия	150 мМ NaCl	30
F11	7,0	Фосфат натрия	150 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы	30
F12	7,0	Фосфат натрия	150 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30
F13	6,5	Сукцинат натрия	25 мМ NaCl	30
F14	6,5	Сукцинат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы	30
F15	6,5	Сукцинат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30
F16	6,5	Сукцинат натрия	150 мМ NaCl	30

F17	6,5	Сукцинат натрия	150 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы	30
F18	6,5	Сукцинат натрия	150 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30

Составы подвергали мониторингу с течением времени с учетом внешнего вида, pH, концентрации белка, осмоляльности, термической стабильности, чистоты по размеру и гетерогенности заряда. Все тестируемые составы не демонстрировали значительных изменений pH, концентрации белка или осмоляльности в течение исследования. В отличие от этого, подгруппы составов демонстрировали различия во внешнем виде, термической стабильности, чистоте по размеру и гетерогенности заряда. В частности, все составы без трегалозы демонстрировали опалесценцию - внешний вид, наблюдаемый в высокодисперсных системах с небольшой непрозрачностью - через 14 дней в условиях ускоренных испытаний (50°C). Все другие составы оставались бесцветными, прозрачными и не содержали видимых частиц после 4 недель при 2-8°C и 14 дней в условиях ускоренных испытаний (50°C). Эти результаты свидетельствуют о том, что компонент трегалоза придает стабильность жидким составам, содержащим M281. Термическую стабильность разных составов определяли посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (фиг. 1). Результаты свидетельствуют о том, что повышенную стабильность придавали составам, имеющим более низкую концентрацию хлорида натрия или содержащим трегалозу. Чистоту по размеру разных составов определяли посредством эксклюзионной хроматографии (фиг. 2). Результаты свидетельствуют о том, что составы, имеющие низкую концентрацию хлорида натрия и содержащие трегалозу при pH 6,5, демонстрируют наибольшую стабильность чистоты по размеру с течением времени. Гетерогенность заряда разных составов определяли посредством капиллярного изоэлектрофокусирования (cIEF) в условиях ускоренных испытаний (50°C) (фиг. 3). Различные концентрации разных стабилизаторов, например, хлорида натрия, трегалозы, PS 80, не влияли значительно на гетерогенность заряда составов с течением времени. В отличие от этого, pH составов имеет значимый эффект, в частности, составы при pH 6,5 демонстрировали лучшее поддержание гетерогенности заряда через 1 и 2 недели по сравнению с составами при pH 7 или pH 7,5. Чистоту разных составов измеряли с помощью CE-SDS Caliper в невозстановительных условиях ускоренных испытаний (фиг. 4) и в восстановительных условиях ускоренных испытаний (50°C) (фиг. 5). Результаты свидетельствуют о том, что повышенную стабильность с течением времени придавали составам, содержащим трегалозу и забуференным при pH 6,5 по сравнению с pH 7 или pH 7,5.

В целом, составы с трегалозой являлись более стабильными, чем составы без трегалозы. Составы с 25 мМ NaCl являлись более стабильными, чем составы, содержащие 150 мМ NaCl. В заключение, результат скрининга этого состава свидетельствует о том, что среди тестируемых составов, состав с 25 мМ NaCl и 90,5 мг/мл трегалозы демонстрирует наибольшую стабильность, и стабильность, в достаточной степени, сохранялась в течение 1 и 2 недель.

Для определения того, как pH состава влияет на стабильность состава, выбранные составы антитела (10 мг/мл) в 25 мМ буфере лимонной кислоты и буфере двухосновного фосфата получали при разном pH и свойствах состава (например, внешнем виде, pH, концентрации белка, осмоляльности, термической стабильности, чистоты по размеру, гетерогенности заряда, и т.д.) измеряли и сравнивали. Получали выбранные составы, приведенные в табл. 2.

Таблица 2

Состав	pH	Буфер (25 мМ)	Антитело, мг/мл
F19	5,0	Буфер лимонной кислоты и двухосновного фосфата	10
F20	5,5	Буфер лимонной кислоты и двухосновного фосфата	10
F21	6,0	Буфер лимонной кислоты и двухосновного фосфата	10
F22	6,5	Буфер лимонной кислоты и двухосновного фосфата	10
F23	7,0	Буфер лимонной кислоты и двухосновного фосфата	10
F24	7,5	Буфер лимонной кислоты и двухосновного фосфата	10
F25	8,0	Буфер лимонной кислоты и двухосновного фосфата	10

Составы подвергали мониторингу с течением времени с учетом внешнего вида, pH, концентрации белка, осмоляльности, термической стабильности, чистоты по размеру и гетерогенности заряда. Все составы не демонстрировали значительных изменений внешнего вида, pH, концентрации белка или осмоляльности в течение исследования. В отличие от этого, подгруппы составов демонстрировали различия по чистоте по размеру, гетерогенности заряда и термической стабильности. Чистоту по размеру разных составов определяли посредством эксклюзионной хроматографии (фиг. 6). Составы при pH 5, pH 7, pH 7,5 и pH 8 демонстрировали сниженное количество молекул целевого размера (обозначаемые как

главный или целевой пик) по сравнению с составами при pH 6 или 6,5. Эти результаты свидетельствуют о том, что составы при pH 6 и 6,5 демонстрируют более высокую чистоту по размеру. Гетерогенность заряда разных составов определяли посредством капиллярного изоэлектрофокусирования (cIEF) в условиях ускоренных испытаний (50°C) (фиг. 7). Составы при pH 5,5, 6,0 и 6,5 демонстрировали лучшее поддержание гетерогенности заряда по сравнению с составами, забуференными при более высоких тестируемых pH. Распределение по размеру в разных составах определяли посредством динамического светорассеяния (фиг. 8). Составы при pH 5,5-7,5 не демонстрировали значимых изменений распределения по размеру. В отличие от этого, составы при pH 5 и pH 8 демонстрировали изменения распределения по размеру, что свидетельствует о том, что составы при pH 5 или 8 являются нестабильными и могут образовывать продукты деградации с течением времени. Чистоту разных составов измеряли с помощью CE-SDS Caliper в невосстановительных ускоренных условиях испытания (50°C) (фиг. 9) и в восстановительных ускоренных условиях испытания (50°C) (фиг. 10). Результаты свидетельствуют о том, что повышенную стабильность придавали составам, забуференным при pH 5, 5,5, 6 или 6,5, и эту стабильность сохраняли в восстановительных (в присутствии β-меркаптоэтанола) или невосстановительных (в присутствии N-этилmaleимида) ускоренных условиях испытания. Термическую стабильность разных составов определяли посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (фиг. 11). Составы, забуференные при pH 5,5, pH 6 и pH 6,5, демонстрировали более высокую термическую стабильность по сравнению с составами, забуференными при pH 7, pH 7,5 или pH 8. Наибольшую термическую стабильность придавали составам, забуференным при pH 6,5, при условии, что состав 22 имел наибольшую Tm начала и значения Tm1.

В заключение, результаты этого опытного испытания жидких составов свидетельствуют о том, что стабильность придавали жидким составам антитела, полученным с помощью 25 мМ NaCl и 90,5 мг/мл трегалозы и забуференным при pH 6,5.

Пример 2. Анализ стабильности для определения стабильности выбранных составов при подвергании механическому, химическому и термическому стрессу.

Для исследования и сравнения стабильности выбранных составов в присутствии стресса выбранные составы получали и подвергали разному стрессу, включая механическое перемешивание, видимый свет, УФ-излучение, высокую температуру, многократное замораживание-размораживание и воздействие окислителей.

Результаты.

Получали выбранные составы, приведенные в табл. 3.

Таблица 3

Компоненты и буферные условия для выбранных составов				
Соста в	pH	Буфер (25 мМ)	Регулятор тоничности, стабилизатор, поверхностно-активное вещество	Антитело, мг/мл
F26	6,5	Фосфат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	10
F27	6,5	Сукцинат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	10
F28	6,5	Фосфат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30
F29	6,5	Сукцинат натрия	25 мМ NaCl+90,5 мг/мл трегалозы+0,01% масс./об. PS 80	30
F30	6,5	Фосфат натрия	25 мМ NaCl+0,01% масс./об. PS 80	30
F31	6,5	Сукцинат натрия	25 мМ NaCl+0,01% масс./об. PS 80	30

Стресс при перемешивании.

Составы подвергали механическому перемешиванию при 250 об./мин., 25°C в течение 5 или 10 дней. Составы не демонстрировали значительного изменения внешнего вида, концентрации белка, pI, чистоты по размеру или чистоты заряда. Примечательно, что составы демонстрировали схожую долю главного пика, кислого пика и основного пика в анализе cIEF, чистоту по размеру, измеряемую с помощью анализа Caliper в невосстановительных и восстановительных условиях, и средний размер частиц и PdI при анализе DLS по сравнению с каждым из других составов и с течением времени (табл. 4). При анализе SEC перемешивание приводило к небольшому снижению процента главного пика относительно общего содержания и повышенному содержанию агрегатов.

Компоненты составов и буферные условия

Анализы	№	ID образца	Т0	Исследование перемешивания		
				5D	10D	
Внешний вид	F2 6	201504 01	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	
	F2 7	201504 02				
Концентрация, мг/мл	F2 6	201504 01	10,7	10,5	10,5	
	F2 7	201504 02	10,0	9,7	9,7	
pH	F2 6	201504 01	6,42	6,41	6,38	
	F2 7	201504 02	6,55	6,52	6,54	
SEC	% главного пика	F2 6	201504 01	98,0	97,9	97,3
		F2 7	201504 02	98,0	97,7	97,2
	% пика HMW	F2 6	201504 01	2,0	2,1	2,7
		F2 7	201504 02	2,0	2,2	2,8
	% пика LMW	F2 6	201504 01	ND	ND	ND
		F2 7	201504 02	ND	ND	0,1
сIEF	pI	F2 6	201504 01	8,81	NA	8,82
		F2 7	201504 02	8,82	NA	8,81
	% главного пика	F2 6	201504 01	65,9	NA	64,2

		F2 7	201504 02	64,6	NA	65,0
	% кислого пика	F2 6	201504 01	31,7	NA	32,6
		F2 7	201504 02	32,3	NA	32,1
	% основного пика	F2 6	201504 01	2,4	NA	3,2
		F2 7	201504 02	3,1	NA	2,9
Caliper в восстановительных условиях	% чистоты	F2 6	201504 01	97,7	NA	98,3
		F2 7	201504 02	97,5	NA	97,4
	Размер LC, кДа	F2 6	201504 01	43,9	NA	42,3
		F2 7	201504 02	43,6	NA	41,8
	Размер HC, кДа	F2 6	201504 01	56,8	NA	56,0
		F2 7	201504 02	56,8	NA	55,1
Caliper в невосстановительных условиях	% чистоты	F2 6	201504 01	98,0	NA	98,3
		F2 7	201504 02	98,0	NA	98,4
	Размер, кДа	F2 6	201504 01	169,5	NA	162,7
		F2 7	201504 02	170,8	NA	160,9
DLS	Zсредн.	F2 6	201504 01	15,5	NA	15,4
	(d, нм)	F2 7	201504 02	15,5	NA	15,4
	Pdl	F2 6	201504 01	0,10	NA	0,09
		F2 7	201504 02	0,11	NA	0,11

Термический стресс.

Составы подвергали воздействию термического стресса при 40°C в течение 5 или 10 дней. Составы не демонстрировали значительных изменений внешнего вида, концентрации белка, pI, чистоты по размеру, оцениваемых посредством SEC или DLS, или чистоты заряда (табл. 5). Составы демонстрировали уменьшение главного пика в анализе cIEF и повышение процентной доли кислых пиков, однако, все тестируемые составы (табл. 3) демонстрировали схожую величину изменений.

Таблица 5

Результаты SEC, cIEF, Caliper в восстановительных условиях, Caliper в невосстановительных условиях, анализа внешнего вида, концентрации белка, pH для состава 26 и 27 после термического стресса

Анализы		№	ID образца	T0	Исследование термической стабильности		
					5D	10D	
Внешний вид		F2 6	201504 01	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	
		F2 7	201504 02				
Концентрация, мг/мл		F2 6	201504 01	10,7	10,5	10,7	
		F2 7	201504 02	10,0	9,7	9,7	
pH		F2 6	201504 01	6,42	6,40	6,41	
		F2 7	201504 02	6,55	6,51	6,53	
SEC	% главного пика	F2 6	201504 01	98,0	98,1	97,8	
		F2 7	201504 02	98,0	98,0	97,9	
	% пика HMW	F2 6	201504 01	2,0	1,7	1,9	
		F2 7	201504 02	2,0	1,9	1,9	
	% пика LMW	F2 6	201504 01	ND	0,1	0,3	
		F2 7	201504 02	ND	0,1	0,2	
cIEF	pI	F2 6	201504 01	8,81	NA	8,82	
		F2 7	201504 02	8,82	NA	8,81	
	% главного пика	F2 6	201504 01	65,9	NA	54,3	
		F2 7	201504 02	64,6	NA	56,3	
	% кислого пика	F2 6	201504 01	31,7	NA	41,2	
		F2 7	201504 02	32,3	NA	39,9	
	% основного пика	F2 6	201504 01	2,4	NA	4,4	
		F2 7	201504 02	3,1	NA	3,8	
	Caliper в восстановительных условиях	% чистоты	F2 6	201504 01	97,7	NA	97,3
			F2 7	201504 02	97,5	NA	97,4

	Размер LC, кДа	F26	20150401	43,9	NA	42,0
		F27	20150402	43,6	NA	42,8
	Размер HC, кДа	F26	20150401	56,8	NA	55,5
		F27	20150402	56,8	NA	56,8
Caliper в невосстановительных условиях	% чистоты	F26	20150401	98,0	NA	97,9
		F27	20150402	98,0	NA	98,1
	Размер, кДа	F26	20150401	169,5	NA	160,1
		F27	20150402	170,8	NA	163,5
DLS	Зсредн. (d, нм)	F26	20150401	15,5	NA	15,8
		F27	20150402	15,5	NA	15,3
	PdI	F26	20150401	0,10	NA	0,10
		F27	20150402	0,11	NA	0,10

Стресс при воздействии видимого света.

Составы подвергали стрессу воздействия видимого света 5000 люкс при 25°C в течение 5 или 10 дней. Составы не демонстрировали значимых различий внешнего вида, концентрации белка, pH, pI, чистоты при Caliper в невосстановительных условиях, среднего размера частиц или PdI при анализе DLS (табл. 6). Наблюдали небольшое снижение чистоты белка по результатам SEC, cIEF и Caliper в восстановительных условиях.

Таблица 6
Результаты SEC, cIEF, Caliper в восстановительных условиях, Caliper в невосстановительных условиях, анализа внешнего вида, концентрации белка, pH для состава 26 и 27 после стресса при воздействии видимого света

Анализ	№	ID образца	T0	Исследование чувствительности к видимому свету			
				Видимый свет		Защита от видимого света	
				5D	10D	5D	10D
Внешний вид	F26	20150401	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	Бесцветный,	Бесцветный,	Бесцветный,	Бесцветный,
	F27	20150402		прозрачный, не содержит видимых частиц	прозрачный, не содержит видимых частиц	прозрачный, не содержит видимых частиц	прозрачный, не содержит видимых частиц

						частиц	виды мых частиц	частиц
Концентрация, мг/мл		F26	20150401	10,5	10,6	10,6	10,5	10,5
		F27	20150402	9,7	9,7	9,7	9,8	9,7
pH		F26	20150401	6,39	6,40	6,39	6,40	6,39
		F27	20150402	6,51	6,53	6,51	6,52	6,51
SEC	% главного пика	F26	20150401	98,0	97,3	96,3	98,2	98,2
		F27	20150402	98,0	96,8	96,0	98,2	98,2
	% пика HMW	F26	20150401	2,0	2,6	3,5	1,8	1,8
		F27	20150402	2,0	3,1	3,8	1,8	1,8
	% пика LMW	F26	20150401	ND	0,1	0,3	ND	0,1
		F27	20150402	ND	0,1	0,2	ND	ND
сIEF	pI	F26	20150401	8,81	NA	8,82	NA	8,82
		F27	20150402	8,82	NA	8,81	NA	8,81
	% главного пика	F26	20150401	65,9	NA	59,7	NA	64,5
		F27	20150402	64,6	NA	59,4	NA	64,5
	% кислого пика	F26	20150401	31,7	NA	37,2	NA	33,0
		F27	20150402	32,3	NA	37,3	NA	32,3
	% основного пика	F26	20150401	2,4	NA	3,1	NA	2,5
		F27	20150402	3,1	NA	3,3	NA	3,2
Calірег в восстановительных условиях	% чистоты	F26	20150401	97,7	NA	96,3	NA	98,4
		F27	20150402	97,5	NA	95,2	NA	95,8
	Размер LC, кДа	F26	20150401	43,9	NA	41,7	NA	41,5
		F27	20150402	43,6	NA	41,9	NA	42,4
Размер HC, кДа	F26	20150401	56,8	NA	55,5	NA	55,1	
	F27	20150402	56,8	NA	56,7	NA	56,3	
Calірег в невосстановительных условиях	% чистоты	F26	20150401	98,0	NA	97,7	NA	98,3
		F27	20150402	98,0	NA	97,9	NA	98,2
	Размер, кДа	F26	20150401	169,5	NA	163,9	NA	162,9
		F27	20150402	170,8	NA	160,9	NA	160,8
DLS	Zсредн. (d, нм)	F26	20150401	15,5	NA	16,2	NA	15,4
		F27	20150402	15,5	NA	15,3	NA	15,2
	PdI	F26	20150401	0,10	NA	0,13	NA	0,07
		F27	20150402	0,11	NA	0,09	NA	0,08

Стресс при воздействии УФ-излучения.

Составы подвергали стрессу воздействия УФ-излучения 200 Вт/м при 25°C в течение 10 часов. Составы не демонстрировали значимых различий внешнего вида, концентрации белка, pH, pI, чистоты при Calірег в невосстановительных условиях и среднего размер частиц или PdI при анализе DLS (табл. 7). Наблюдали снижение чистоты белка по результатам SEC, сIEF и Calірег в восстановительных условиях.

Таблица 7

Результаты SEC, сIEF, Caliper в восстановительных условиях, Caliper в невосстановительных условиях, анализа внешнего вида, концентрации белка, рН для состава 26 и 27 после стресса при воздействии УФ-излучения

Анализы		№	ID образца	Т0	Исследование чувствительности к УФ-излучению		
					УФ-излучение, 10 ч.	Защита от излучения, 10 ч.	
Внешний вид		F2 6	201504 01	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц	
		F2 7	201504 02				
Концентрация, мг/мл		F2 6	201504 01	10,7	10,5	10,7	
		F2 7	201504 02	10,0	9,8	9,7	
рН		F2 6	201504 01	6,42	6,39	6,41	
		F2 7	201504 02	6,55	6,51	6,53	
SEC	% главного пика	F2 6	201504 01	98,0	96,7	97,8	
		F2 7	201504 02	98,0	96,2	97,9	
	% пика HMW	F2 6	201504 01	2,0	3,2	1,9	
		F2 7	201504 02	2,0	3,8	1,9	
	% пика LMW	F2 6	201504 01	ND	0,1	0,3	
		F2 7	201504 02	ND	0,1	0,2	
сIEF	рI	F2 6	201504 01	8,81	8,81	8,82	
		F2 7	201504 02	8,82	8,81	8,81	
	% главного пика	F2 6	201504 01	65,9	62,0	54,3	
		F2 7	201504 02	64,6	61,	56,3	
	% кислого пика	F2 6	201504 01	31,7	35,3	41,2	
		F2 7	201504 02	32,3	35,3	39,9	
	% основного пика	F2 6	201504 01	2,4	2,7	4,4	
		F2 7	201504 02	3,1	3,0	3,8	
	Caliper в	% чистоты	F2	201504	97,7	96,5	97,3

восстановительных условиях		6	01			
		F27	20150402	97,5	96,5	97,4
	Размер LC, кДа	F26	20150401	43,9	43,3	42,0
		F27	20150402	43,6	42,7	42,8
	Размер HC, кДа	F26	20150401	56,8	56,4	55,5
		F27	20150402	56,8	55,5	56,8
Caliper в невосстановительных условиях	% чистоты	F26	20150401	98,0	98,2	97,9
		F27	20150402	98,0	98,2	98,1
	Размер, кДа	F26	20150401	169,5	162,1	160,1
		F27	20150402	170,8	163,7	163,5
DLS	Zсредн. (d, нм)	F26	20150401	15,5	15,2	15,8
		F27	20150402	15,5	15,2	15,3
	PdI	F26	20150401	0,10	0,08	0,10
		F27	20150402	0,11	0,09	0,10

Окислительный стресс.

Составы подвергали окислительному стрессу посредством воздействия 1% H₂O₂ при 2-8°C в течение 6 часов. Составы не демонстрировали значимых различий внешнего вида, концентрации белка, pH, pI, чистоты при SEC, чистоты при Caliper в восстановительных и невосстановительных условиях или среднего размера частиц и PdI при анализе DLS (табл. 8). Наблюдали небольшое снижение в случае cIEF.

Таблица 8

Результаты SEC, cIEF, Caliper в восстановительных условиях, Caliper в невосстановительных условиях, анализа внешнего вида, концентрации белка, pH в случае состава 26 и 27 после воздействия окислительного стресса

Анализ	№	ID образца	T0	Окисление		
				1 ч.	3 ч.	6 ч.
Внешний вид	F26	20150401	Бесцветный, прозрачный, не содержит видимых частиц			
	F27	20150402				
Концентрация, мг/мл	F26	20150401	10,5	11,2	11,3	11,3
	F27	20150402	9,8	10,5	10,6	10,5

pH		F26	20150401	6,39	6,28	6,30	6,31	
		F27	20150402	6,51	6,42	6,42	6,43	
SEC	% главного пика	F26	20150401	98,1	98,3	98,3	98,4	
		F27	20150402	98,1	98,2	98,2	98,2	
	% пика HMW	F26	20150401	1,9	1,6	1,6	1,5	
		F27	20150402	1,9	1,7	1,6	1,6	
	% пика LMW	F26	20150401	ND	0,1	0,1	0,2	
		F27	20150402	ND	0,1	0,1	0,2	
cIEF	pI	F26	20150401	8,82	NA	NA	8,81	
		F27	20150402	8,82	NA	NA	8,81	
	% главного пика	F26	20150401	65,8	NA	NA	62,7	
		F27	20150402	64,4	NA	NA	61,4	
	% кислого пика	F26	20150401	31,9	NA	NA	34,4	
		F27	20150402	32,8	NA	NA	35,7	
	% основного пика	F26	20150401	2,4	NA	NA	2,9	
		F27	20150402	2,7	NA	NA	2,9	
	Caliper в восстановительных условиях	% чистоты	F26	20150401	97,6	NA	NA	97,5
			F27	20150402	97,6	NA	NA	97,3
Размер LC, кДа		F26	20150401	43,9	NA	NA	43,6	
		F27	20150402	43,7	NA	NA	43,4	
Размер HC, кДа		F26	20150401	57,0	NA	NA	58,1	
		F27	20150402	56,8	NA	NA	57,8	
Caliper в восстановительных условиях	% чистоты	F26	20150401	97,9	NA	NA	97,9	
		F27	20150402	98,1	NA	NA	97,8	
	Размер, кДа	F26	20150401	167,1	NA	NA	167,2	
		F27	20150402	166,0	NA	NA	167,2	
	DLS	Зсредн. (d, нм)	F26	20150401	15,1	15,8	14,7	14,9
			F27	20150402	15,8	14,9	14,8	14,7
PdI		F26	20150401	0,09	0,15	0,09	0,09	
		F27	20150402	0,13	0,09	0,09	0,08	

Стресс при замораживании-размораживании.

Составы подвергали замораживанию-размораживанию от -80°C до комнатной температуры (RT) в течение до 10 циклов. Составы не демонстрировали значимых различий внешнего вида, концентрации белка, чистоты при SEC, pI, доли главного пика, кислого пика и основного пика при анализе cIEF, чистоты при анализе Caliper в невосстановительных и восстановительных условиях или среднего размера частиц и PdI при анализе DLS (табл. 9).

Таблица 9

Результаты SEC, cIEF, Caliper в восстановительных условиях, Caliper в невосстановительных условиях, анализа внешнего вида, концентрации белка, pH для состава 26 и 27 после воздействия оксидативного стресса

Анализ	№	ID образца	T0	Замораживание-размораживание		
				Бесцвет	Бесцвет	Бесцвет
Внешний вид	F28	20150401-FT	Бесцвет	Бесцвет	Бесцвет	Бесцвет
	F29	20150402-FT	ный,	ный,	ный,	ный,

	F30	20150403-FT	прозрач ный, не содержит видимых частиц	прозрач ный, не содержит видимых частиц	прозрач ный, не содержит видимых частиц	прозрач ный, не содержит видимых частиц	
	F31	20150404-FT					
Концентрация, мг/мл	F28	20150401-FT	33,9	38,0	38,5	39,1	
	F29	20150402-FT	34,4	37,5	41,2	36,8	
	F30	20150403-FT	29,0	34,0	30,4	32,1	
	F31	20150404-FT	29,2	35,1	29,5	29,5	
рН	F28	20150401-FT	6,40	6,38	6,36	6,37	
	F29	20150402-FT	6,48	6,48	6,45	6,46	
	F30	20150403-FT	6,56	6,54	6,53	6,52	
	F31	20150404-FT	6,53	6,51	6,51	6,51	
Осмоляльность , мОсм/кг	F28	20150401-FT	482	NA	NA	NA	
	F29	20150402-FT	479	NA	NA	NA	
	F30	20150403-FT	113	NA	NA	NA	
	F31	20150404-FT	99	NA	NA	NA	
SEC	% глав ного пика	F28	20150401-FT	97,7	97,7	97,4	97,3
		F29	20150402-FT	97,6	97,6	97,3	97,3
		F30	20150403-FT	97,6	97,5	97,1	97,0
		F31	20150404-FT	97,6	97,6	97,2	97,1
	% пика HM W	F28	20150401-FT	2,3	2,3	2,6	2,6
		F29	20150402-FT	2,4	2,4	2,6	2,7
		F30	20150403-FT	2,4	2,5	2,8	2,9
		F31	20150404-FT	2,4	2,4	2,8	2,8
	% пика LM W	F28	20150401-FT	ND	ND	ND	0,1
		F29	20150402-FT	ND	ND	ND	ND
		F30	20150403-FT	ND	ND	ND	ND
		F31	20150404-FT	ND	ND	0,1	ND
cIEF	pI	F28	20150401-FT	8,83	NA	NA	8,80
		F29	20150402-FT	8,83	NA	NA	8,79
		F30	20150403-FT	8,82	NA	NA	8,79
		F31	20150404-FT	8,82	NA	NA	8,79
	%	F28	20150401-FT	65,7	NA	NA	66,1

	главного пика	F29	20150402-FT	65,4	NA	NA	66,2	
		F30	20150403-FT	64,2	NA	NA	65,8	
		F31	20150404-FT	64,9	NA	NA	66,2	
	% кислотного пика	F28	20150401-FT	31,7	NA	NA	30,9	
		F29	20150402-FT	31,8	NA	NA	30,7	
		F30	20150403-FT	32,8	NA	NA	31,1	
		F31	20150404-FT	32,3	NA	NA	30,5	
	% основного пика	F28	20150401-FT	2,7	NA	NA	3,0	
		F29	20150402-FT	2,8	NA	NA	3,1	
		F30	20150403-FT	3,0	NA	NA	3,1	
		F31	20150404-FT	2,9	NA	NA	3,2	
	Caliper в невосстановительных условиях	% чистоты	F28	20150401-FT	97,7	NA	NA	98,3
F29			20150402-FT	97,5	NA	NA	97,8	
F30			20150403-FT	97,5	NA	NA	97,8	
F31			20150404-FT	97,6	NA	NA	98,4	
Размер LC, кДа		F28	20150401-FT	43,5	NA	NA	42,9	
		F29	20150402-FT	43,7	NA	NA	43,4	
		F30	20150403-FT	43,7	NA	NA	43,3	
		F31	20150404-FT	43,8	NA	NA	42,9	
Размер HC, кДа		F28	20150401-FT	56,5	NA	NA	56,5	
		F29	20150402-FT	56,7	NA	NA	57,1	
		F30	20150403-FT	57,0	NA	NA	57,3	
		F31	20150404-FT	57,0	NA	NA	56,8	
Caliper в невосстановительных условиях		% чистоты	F28	20150401-FT	97,9	NA	NA	98,2
			F29	20150402-FT	97,9	NA	NA	98,3
			F30	20150403-FT	97,7	NA	NA	98,1
			F31	20150404-FT	97,7	NA	NA	98,1
	Размер, кДа	F28	20150401-FT	170,1	NA	NA	162,0	
		F29	20150402-FT	169,7	NA	NA	161,4	
		F30	20150403-FT	169,7	NA	NA	162,5	
		F31	20150404-FT	169,9	NA	NA	163,0	
DLS	Zсредн. (d,	F28	20150401-FT	19,19	NA	NA	19,88	
		F29	20150402-FT	19,34	NA	NA	19,96	
		F30	20150403-FT	14,49	NA	NA	14,51	
	nm)	F31	20150404-FT	14,68	NA	NA	14,87	
		F28	20150401-FT	0,095	NA	NA	0,098	
	PdI	F29	20150402-FT	0,094	NA	NA	0,089	
		F30	20150403-FT	0,056	NA	NA	0,075	
		F31	20150404-FT	0,066	NA	NA	0,077	

Тестируемые выбранные составы сохраняли стабильность при воздействии механического, термического и химического стресса. Составы, забуференные фосфатом натрия или сукцинатом натрия, демонстрировали схожую стабильность во всех тестируемых стрессовых условиях, и подходящими будут любые буферные системы.

Пример 3. Определяет ли состав, содержащий 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 8,7% трегалозы, 0,01% PS 80, забуференный при pH 6,5, подходящую стабильность для инъекции 10 мг/мл и 30 мг/мл M281.

Для определения того, обеспечивают ли составы, содержащие 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 8,7% трегалозы, 0,01% мас./об. PS80, забуференные при pH 6,5, подходящую стабильность для инъекции 10 мг/мл и 30 мг/мл M281, свойства составов оценивали аналитическими способами после воздействия термического стресса и напряжения сдвига.

Получали составы, содержащие 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 8,7% трегалозы, 0,01% мас./об. PS80 и 10 мг/мл или 30 мг/мл M281, забуференные при pH 6,5. Как часть этих исследований использовали спектр аналитических анализов для оценки качества продукта. Среди оцениваемых показателей наиболее существенные изменения в течение исследований наблюдали в вариантах заряда, измеряемых посредством cIEF, и уровнях агрегации, измеряемых посредством SEC. Таким образом, cIEF и SEC выбирали в качестве анализов стабильности. Варианты заряда по результатам cIEF (фиг. 12) и растворимые агрегаты по результатам SEC (фиг. 13) в случае лекарственного продукта при 10 мг/мл (партия E, партия F и партия B) и 30 мг/мл (партия D) сравнивали в длительных условиях стабильности и ускоренных исследованиях стабильности. Скорость деградации основного типа лекарственного продукта M281 по результатам cIEF и SEC при 10 мг/мл и 30 мг/мл являлась сравнимой в условиях длительного хранения (от 2 до 8°C) и в условиях ускоренных испытаний стабильности (25°C).

Данные исследований форсированной деградации, такой как перемешивание, окисление, воздействие термического стресса и напряжения сдвига, приведены в табл. 10-13. Данные свидетельствуют о схожей деградации в составах 10 мг/мл и 30 мг/мл, измеряемой посредством анализов cIEF и SEC.

Таблица 10

Сравнение % уровней главных видов молекул при перемешивании по результатам SEC-ВЭЖХ и cIEF

Перемешивание (дни)	% главных видов молекул по результатам SEC-ВЭЖХ		% главных видов молекул по результатам cIEF	
	10 мг/мл Ab	30 мг/мл Ab	10 мг/мл Ab	30 мг/мл Ab
0	98,0	98,4	65,9	65,6
5	97,9	98,1	NT	NT
10	97,3	98,0	64,2	64,5

¹cIEF=Капиллярное изоэлектрофокусирование; NT=не тестировали; SEC-ВЭЖХ=эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 11

Сравнение % уровней главных видов молекул при окислении по результатам SEC-ВЭЖХ и cIEF

Окисление (часы)	% главных видов молекул по результатам SEC-ВЭЖХ		% главных видов молекул по результатам cIEF	
	10 мг/мл Ab	30 мг/мл Ab	10 мг/мл Ab	30 мг/мл Ab
0	98,1	98,4	65,8	65,6
1	98,3	98,3	NT	NT
3	98,3	98,4	NT	NT
6	98,4	98,4	62,7	65,0

cIEF=Капиллярное изоэлектрофокусирование; NT=не тестировали; SEC-ВЭЖХ=эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 12

Сравнение % уровней главных видов молекул при термическом стрессе при 40°C по результатам SEC-ВЭЖХ и cIEF

Термический стресс (дни)	% главных видов молекул по результатам SEC-ВЭЖХ		% главных видов молекул по результатам cIEF	
	10 мг/мл Ab	30 мг/мл Ab	10 мг/мл Ab	30 мг/мл Ab
0	98,0	98,4	65,9	65,6
5	98,1	97,0	NT	NT
10	97,8	96,7	54,3	54,6

¹cIEF=Капиллярное изоэлектрофокусирование; NT=не тестировали; SEC-ВЭЖХ=эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 13

Сравнение % уровней главных видов молекул при напряжении сдвига по результатам SEC-ВЭЖХ и cIEF

Напряже ние сдвига (циклы) ²	% главных видов молекул по результатам SEC-ВЭЖХ		% главных видов молекул по результатам cIEF	
	10 мг/мл Ab	30 мг/мл Ab	10 мг/мл Ab	30 мг/мл of Ab
0	98,4	98,2	68,7	67,2
1	98,4	98,3	68,4	67,2
5	98,3	98,2	67,9	67,4
10	98,3	98,2	68,0	66,6

¹cIEF=Капиллярное изоэлектрофокусирование; SEC-ВЭЖХ=эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография
²Циклы относятся к количеству раз, когда M281 пропускали через нагнетающий насос для имитации наихудшего сценария

Результаты, касающиеся скорости деградации, наблюдаемой при форсированной деградации и полученные данные о стабильности (фиг. 14-23) свидетельствуют о схожих скоростях деградации для составов, содержащих 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 8,7% трегалозы, 0,01% полисорбата 80 и 10 или 30 мг/мл антитела, забуференных при pH 6,5. Данные свидетельствуют о том, что состав 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 8,7% мас./мас. трегалозы, 0,01% мас./об. полисорбата 80, pH 6,5, обеспечивает стабильность при 10 мг/мл и 30 мг/мл через до 30 месяцев и 18 месяцев, соответственно.

Влияние более высоких уровней полисорбата 80 на частицы, невидимые невооруженным взглядом, в статических и перемешиваемых образцах исследовали в составе, содержащем антитело, 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 8,7% трегалозы, 0,01% PS 80 и 10 или 30 мг/мл антитела, забуференном при pH 6,5. Частицы, невидимые невооруженным взглядом, в образцах состава анализировали на их размер и морфологию с использованием системы визуализации частиц FlowCAM. В кратком изложении, аликвоты составов дегазировали в течение 30 мин при 75 торр и 500 мкл каждого образца инъецировали в анализатор. Фиксировали изображения частиц в жидкости в реальном времени, когда они проходили через проточную кювету. Общее количество частиц, включающее все частицы в образце, собирали и приводили в табл. 14. Количество вычтенных частиц для составов получали с использованием цифрового фильтра в отношении необработанных данных для устранения влияния небелковых повторяющихся и круглых частиц (например, вероятно, пузырьков), что приведено в табл. 15. В этом анализе частицы, составляющие менее 5 мкм, считают слишком маленькими для точной фильтрации или вычитания при анализе изображений частиц.

Таблица 14

Влияние полисорбата 80 на частицы, невидимые невооруженным взглядом (необработанные данные)

Размер	Вода	0,01% PS80, статичес кий образец	0,05% PS80, статичес кий образец	0,10% PS80, статичес кий образец	0,01% PS80, переме шивание	0,05% PS80, переме шивание	0,10% PS80, перемеш ивание
>2 мкм	18	10154	24210	2588	4658	2521	661
>5 мкм	0	4787	10688	1053	1630	1270	249
>10 мкм	0	1492	3563	351	474	298	57
>25 мкм	0	210	476	110	36	10	10

Таблица 15

Влияние полисорбата 80 на частицы, невидимые невооруженным взглядом (вычтенные данные)

Размер	Вода	0,01% PS80, стати ческий образец	0,05% PS80, статичес кий образец	0,10% PS80, статичес кий образец	0,01% PS80, переме шивание	0,05% PS80, переме шивание	0,10% PS80, перемеш ивание
>5 мкм	0	4787	10688	1053	1569	1184	192
>10 мкм	0	1492	3563	351	474	298	57
>25 мкм	0	210	476	110	36	10	10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая: антители, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в количестве 10 или 30 мг/мл, 20-30 мМ фосфата натрия, 20-30 мМ хлорида натрия, 80-100 мг/мл трегалозы, и 0,10-0,005% мас./об. полисорбата 80, забуференная при pH 6,5.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, содержащая 25 мМ фосфата натрия.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, содержащая 25 мМ хлорида натрия.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, содержащая 90-91 мг/мл трегалозы.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, содержащая 90,5 мг/мл трегалозы.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, содержащая 0,01% мас./об. полисорбата 80.

7. Фармацевтическая композиция по п.1, содержащая 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг/мл трегалозы и 0,01% полисорбата 80.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-7, где композиция не содержит какие-либо дополнительные эксципиенты.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая: антители, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в количестве 10 или 30 мг/мл, 20-30 мМ сукцината натрия, 20-30 мМ хлорида натрия, 89-92 мг/мл трегалозы и 0,1-0,005% мас./об. полисорбата 80, забуференная при pH 6,5.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, содержащая 25 мМ сукцината натрия.

11. Фармацевтическая композиция по п.9, содержащая 25 мМ хлорида натрия.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-11, содержащая 90-91 мг/мл трегалозы.

13. Фармацевтическая композиция по п.9, содержащая 90,5 мг/мл трегалозы.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-11, содержащая 0,01% мас./об. полисорбата 80.

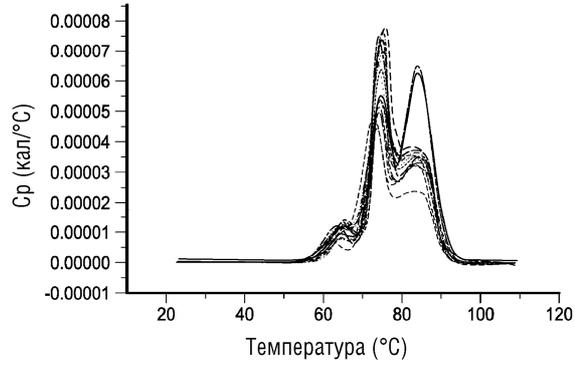
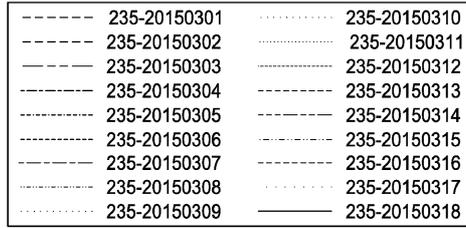
15. Фармацевтическая композиция по п.9, содержащая 25 мМ сукцината натрия, 25 мМ хлорида натрия, 90,5 мг/мл трегалозы и 0,01% полисорбата 80.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-15, где композиция не содержит какие-либо дополнительные эксципиенты.

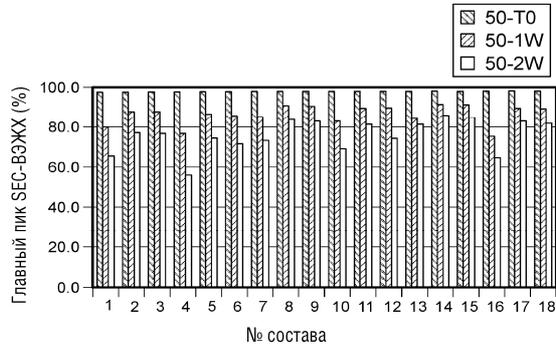
17. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция не содержит какие-либо иные полисорбаты, чем полисорбат 80

18. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция не включает какие-либо иные полимеры, чем полисорбат.

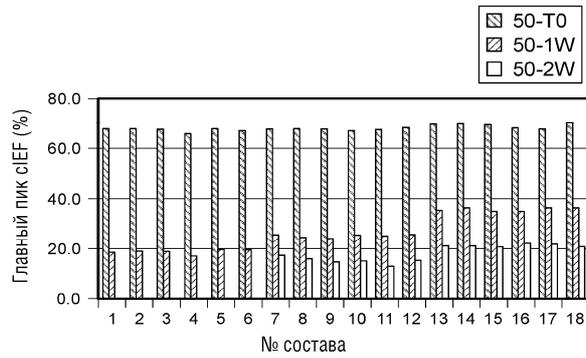
19. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция не включает какие-либо иные полимеры, чем полисорбат 80.



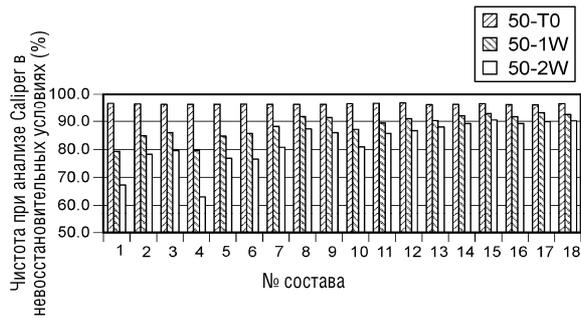
Фиг. 1



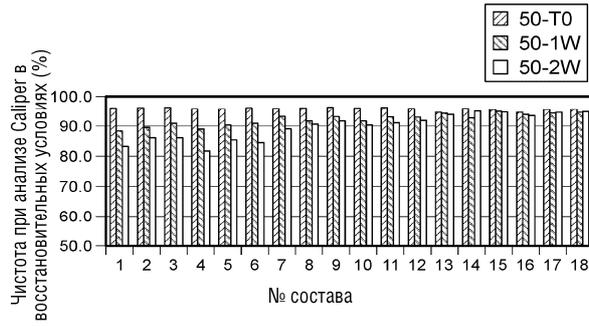
Фиг. 2



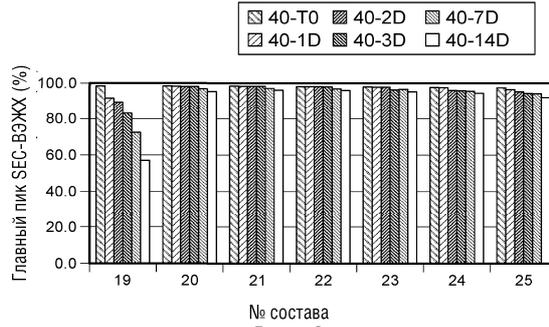
Фиг. 3



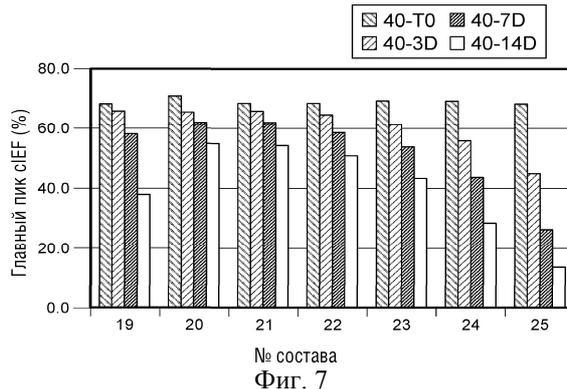
Фиг. 4



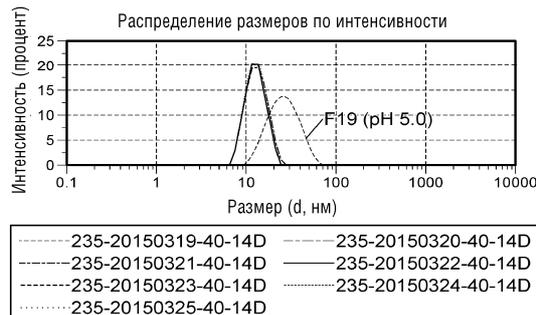
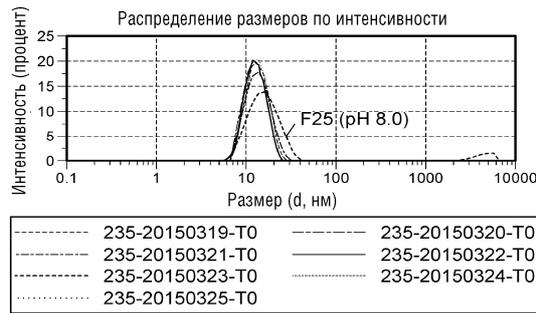
Фиг. 5



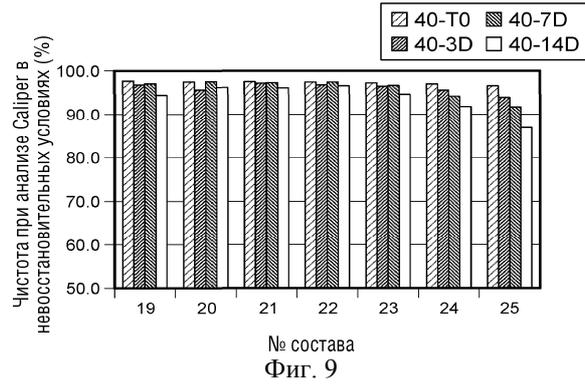
Фиг. 6



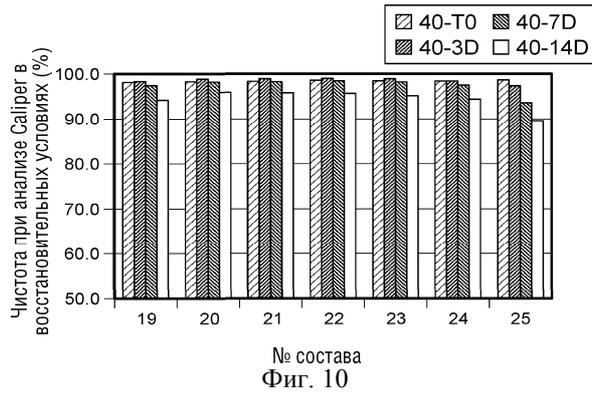
Фиг. 7



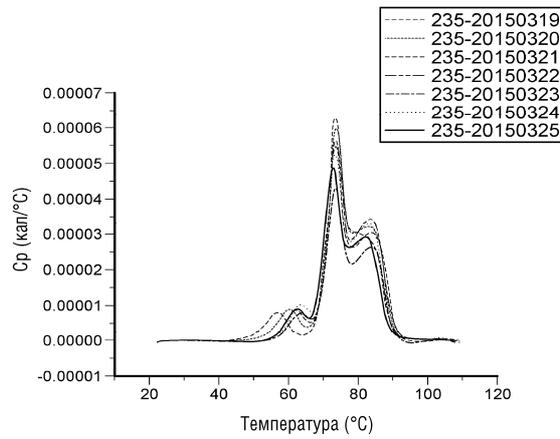
Фиг. 8



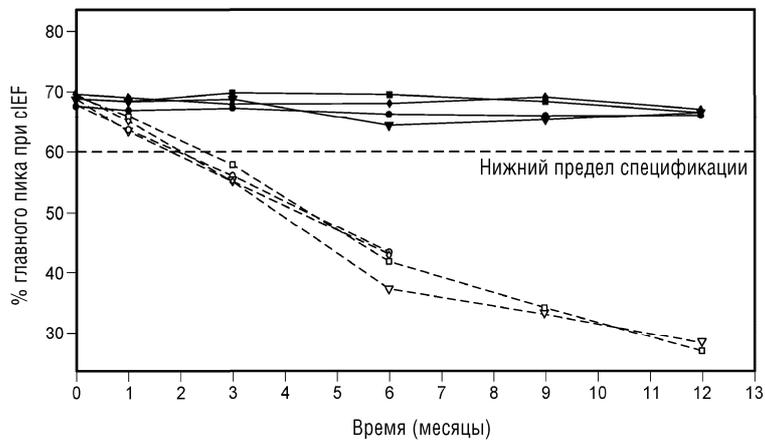
Фиг. 9



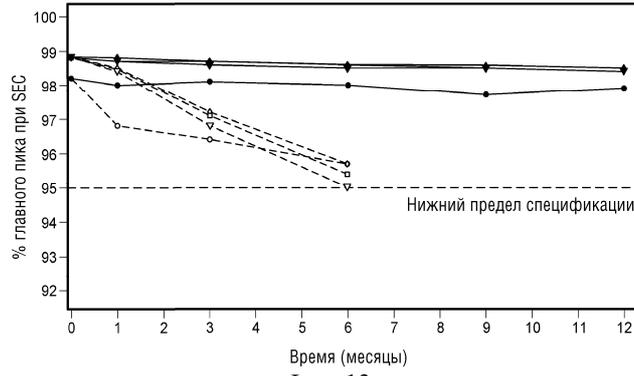
Фиг. 10



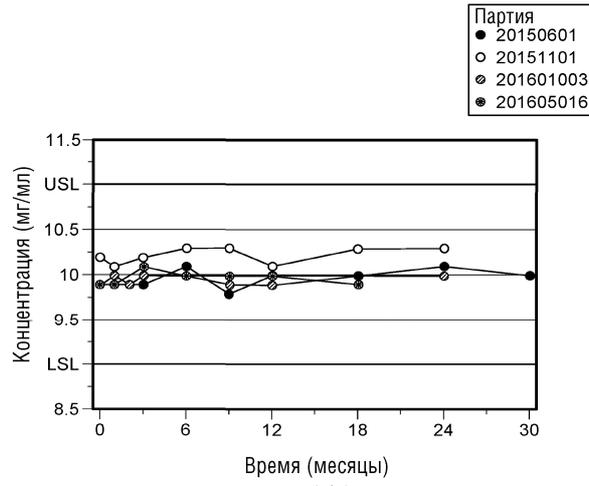
Фиг. 11



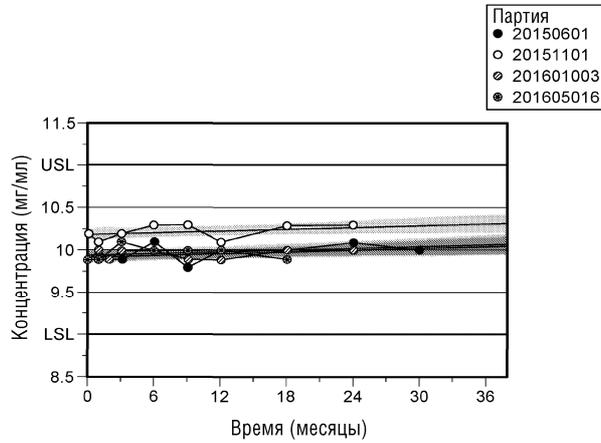
Фиг. 12



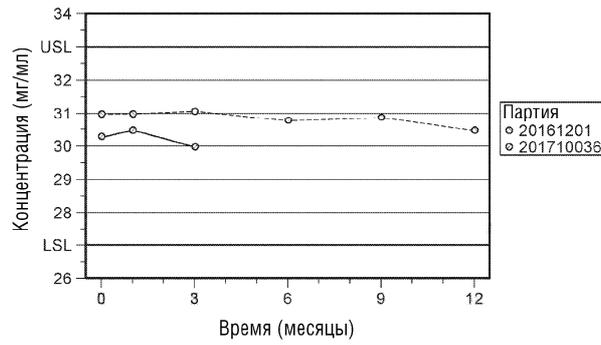
Фиг. 13



Фиг. 14А

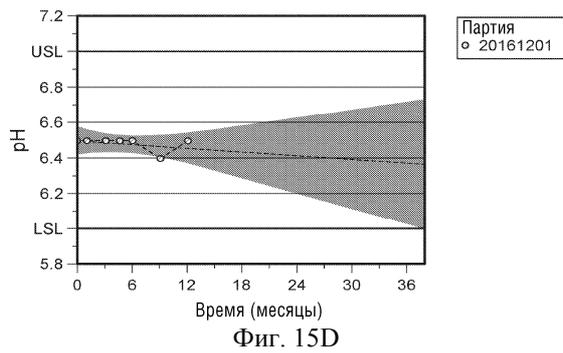
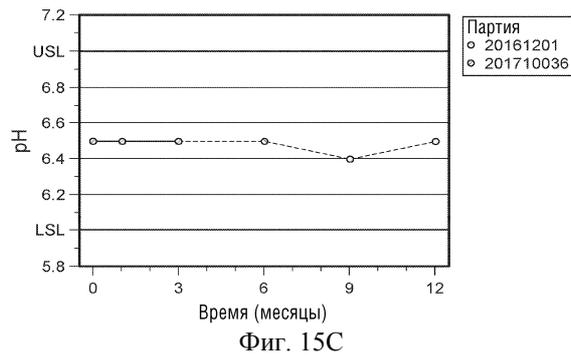
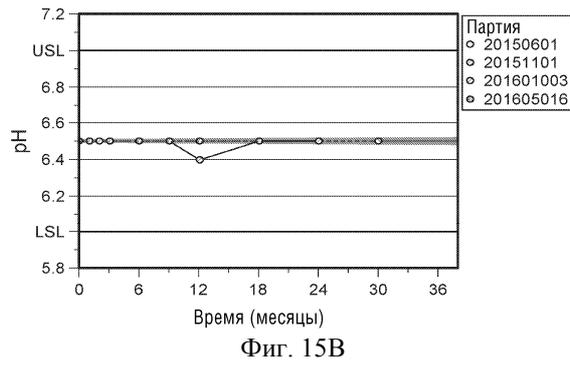
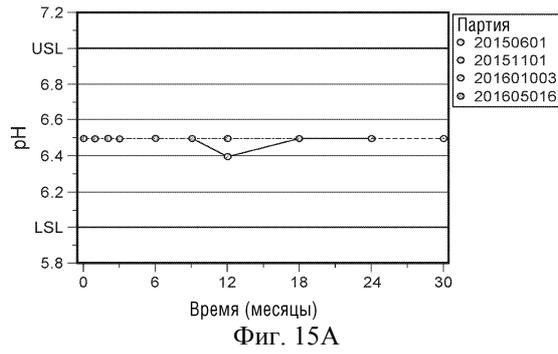
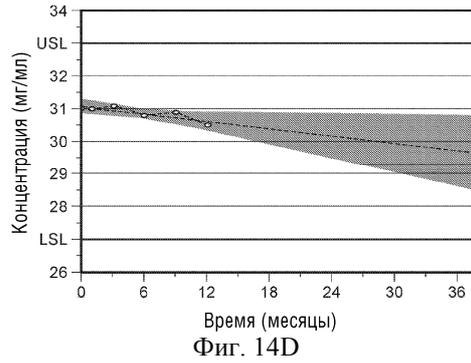


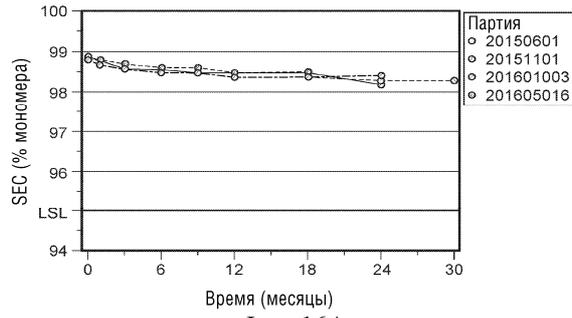
Фиг. 14В



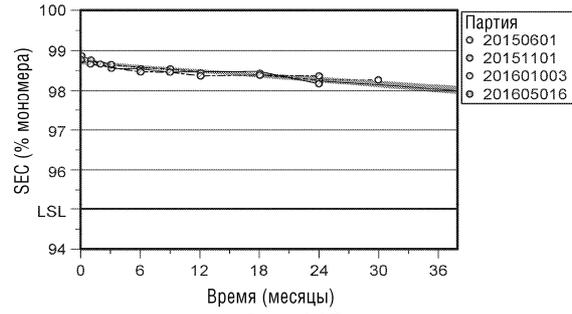
Фиг. 14С

046994

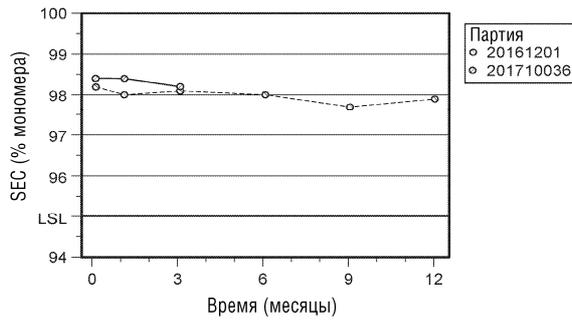




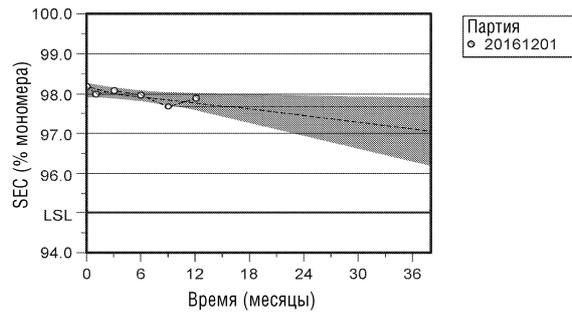
Фиг. 16А



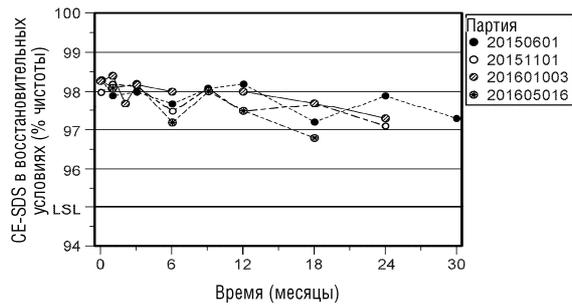
Фиг. 16В



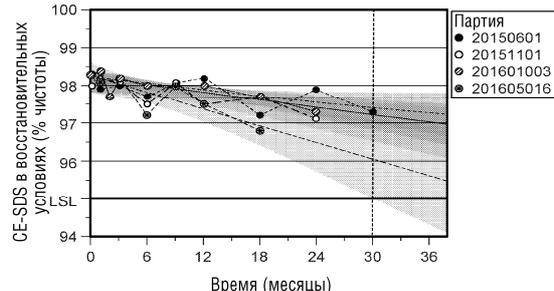
Фиг. 16С



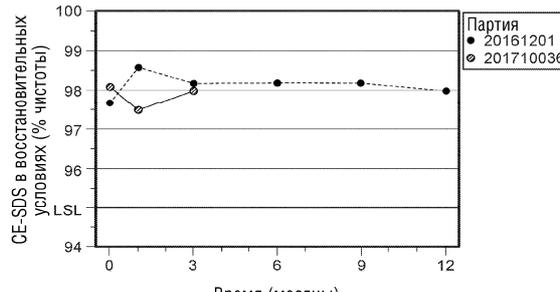
Фиг. 16D



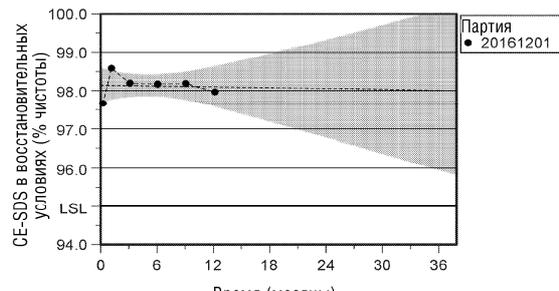
Фиг. 17А



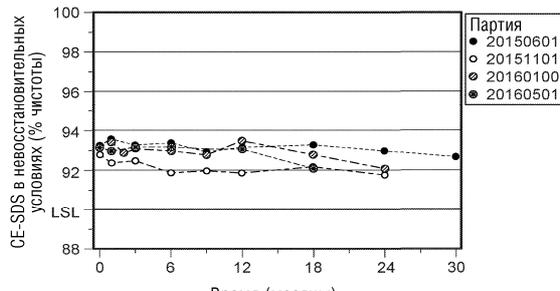
Фиг. 17В



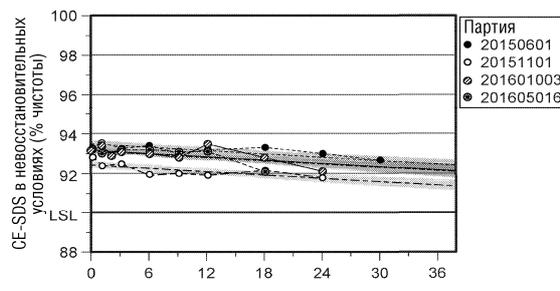
Фиг. 17С



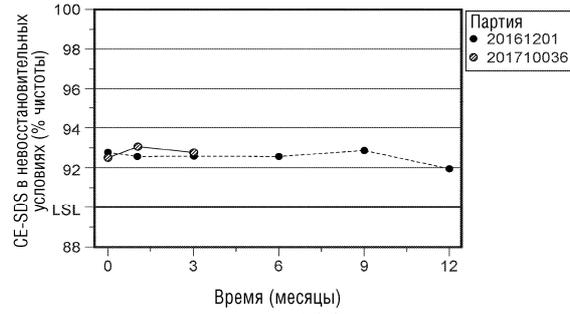
Фиг. 17D



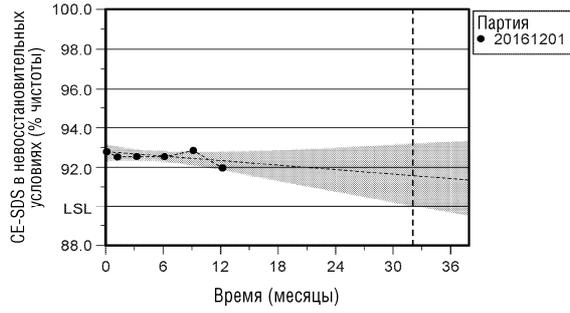
Фиг. 18А



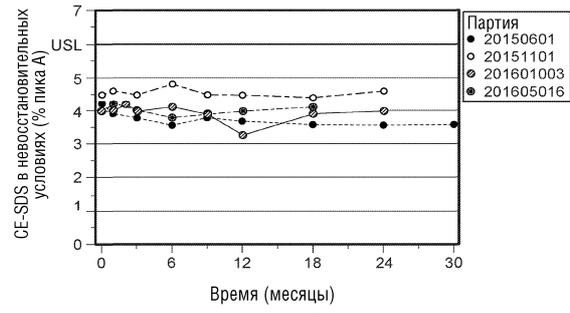
Фиг. 18В



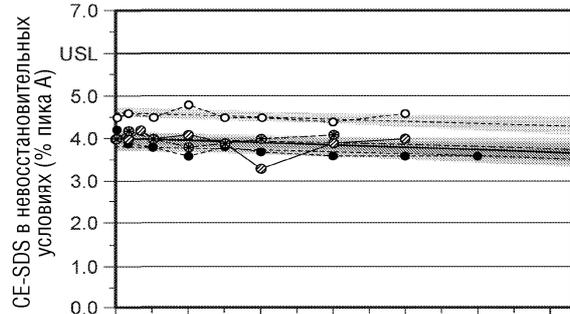
Фиг. 18С



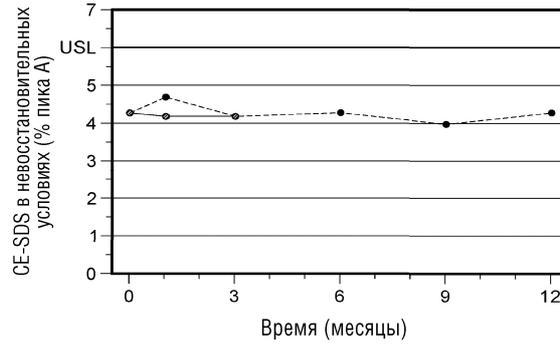
Фиг. 18D



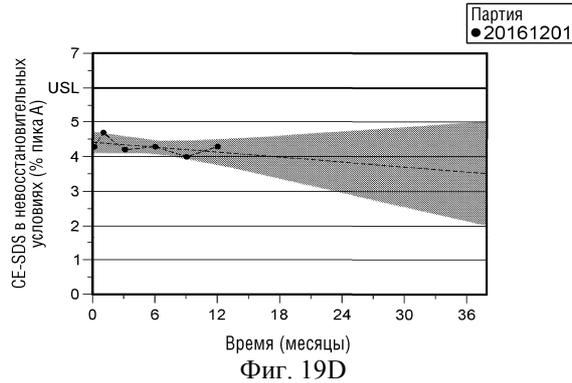
Фиг. 19А



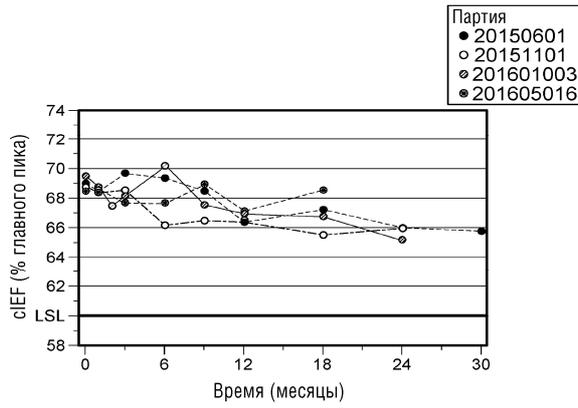
Фиг. 19В



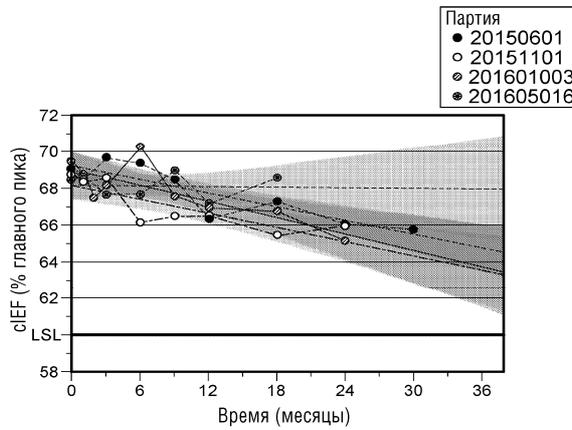
Фиг. 19С



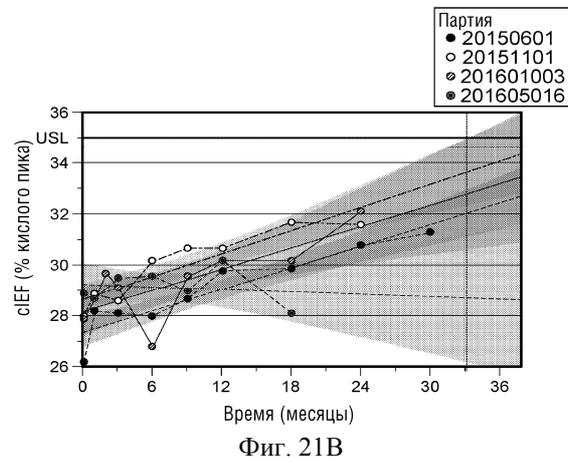
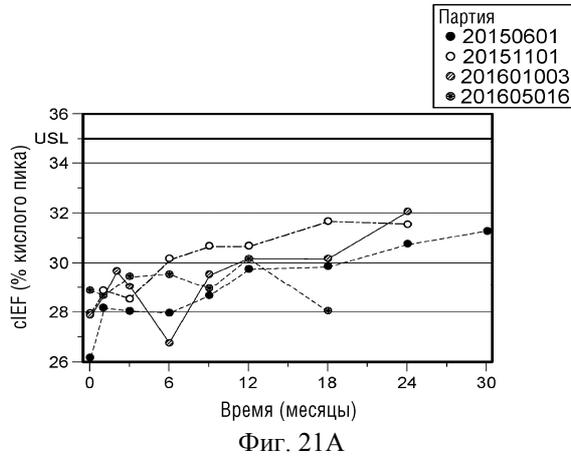
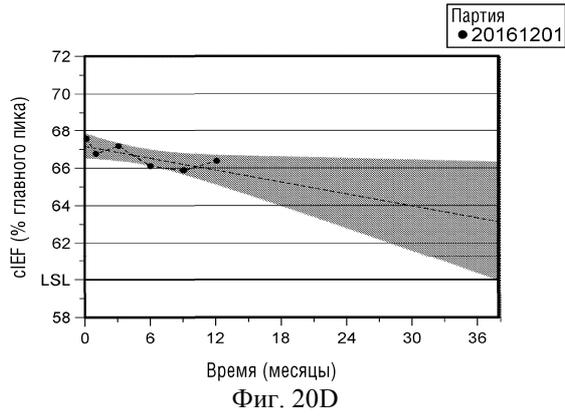
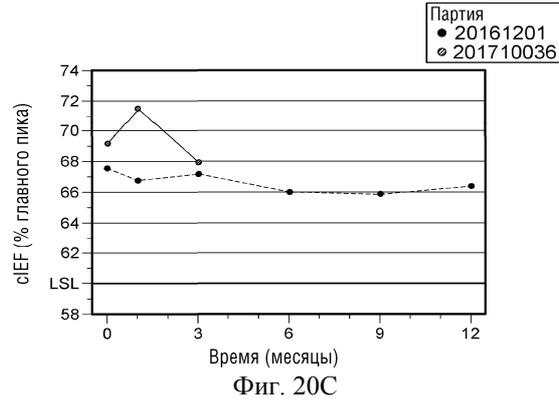
Фиг. 19D

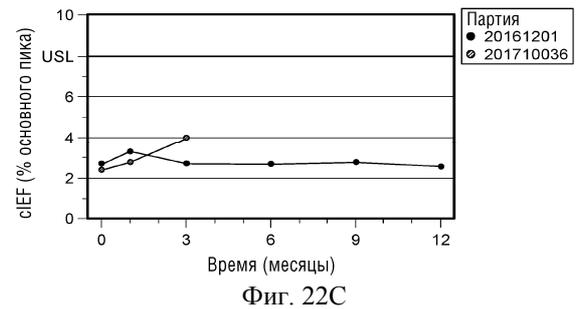
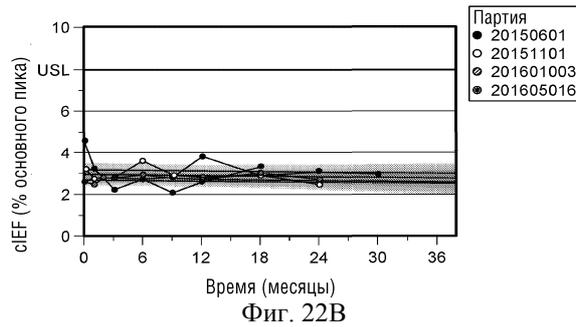
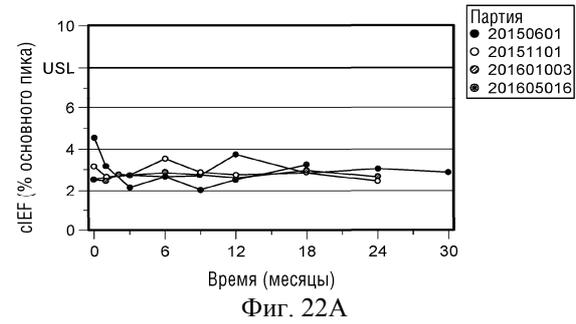
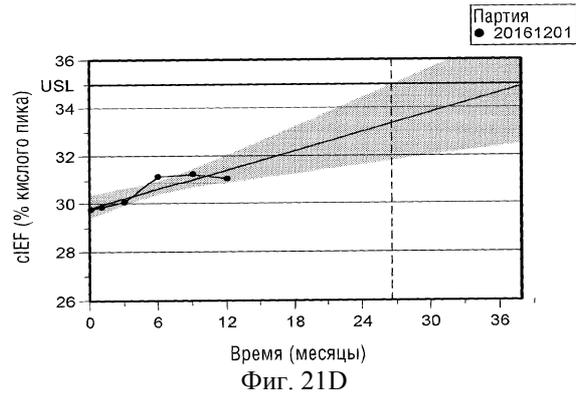
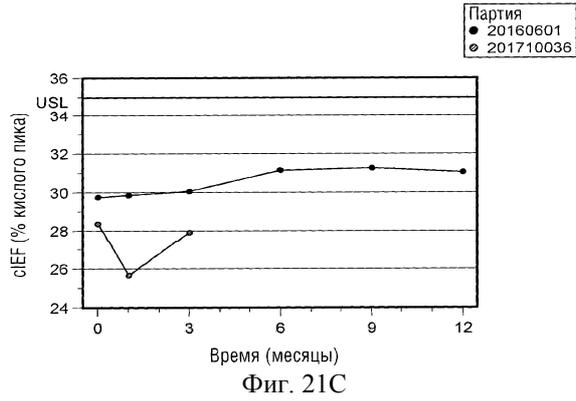


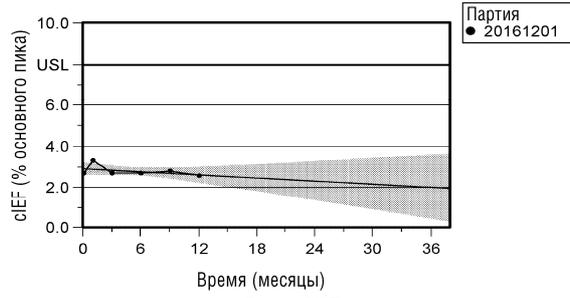
Фиг. 20А



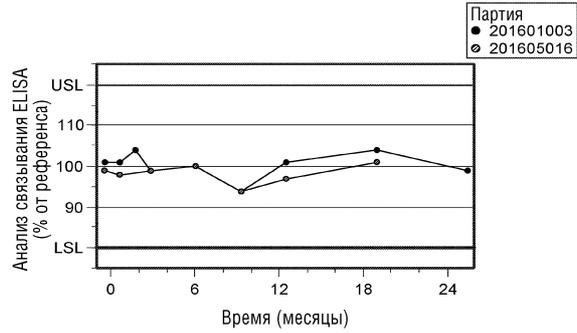
Фиг. 20В



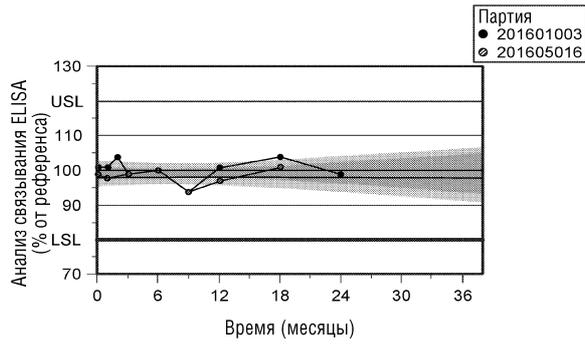




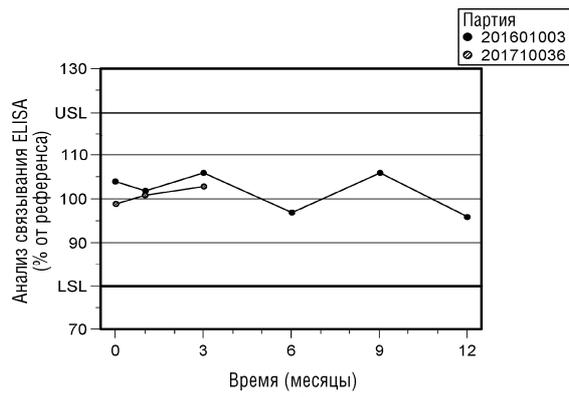
Фиг. 22D



Фиг. 23А



Фиг. 23В



Фиг. 23С

