



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.11.01

(21) Номер заявки  
202291779

(22) Дата подачи заявки  
2020.12.09

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ БИСПЕЦИФИЧНЫЕ  
АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD20 × CD3

(31) 62/946,207

(32) 2019.12.10

(33) US

(43) 2022.11.09

(86) PCT/US2020/064025

(87) WO 2021/119135 2021.06.17

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

(72) Изобретатель:  
Чэн Юань, Тан Сяолин (US)

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

(56) ERIC J. SMITH ET AL.: "A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, 11 December 2015 (2015-12-11), page 17943, XP055241857, DOI: 10.1038/srep17943 page 10 of 12; last two paragraphs WO-A1-2017112762

HONGYAN LIU ET AL.: "Fc Engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, FRONTIERS RESEARCH FOUNDATION, CH, vol. 8, 26 January 2017 (2017-01-26), pages 1-15, XP002794206, ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/FIMMU.2017.00038, page 9, top right

WO-A1-2016081490

WO-A1-2015095392

US-A1-2010303827

US-A1-2005095243

DANI BHAS ET AL.: "High concentration formulation feasibility of human immunoglobulin G for subcutaneous administration", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN

CHEMICAL SOCIETY AND AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, US, vol. 96, no. 6, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 1504-1517, XP002540954, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/JPS.20508, the whole document abstract

WANG WEI ED - BLANCO-PRIETO MARIA J ET AL.: "Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER, NL, vol. 185, no. 2, 20 August 1999 (1999-08-20), pages 129-188, XP002323952, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00152-0, the whole document, page 175, left-hand column

Gutka Hiten: "Rational Selection of Sugars for Biotherapeutic Stabilization: A Practitioner's Perspective", internet, 18 October 2018 (2018-10-18), pages 1-20, XP055783091, Retrieved from the Internet: URL:https://bioprocessintl.com/manufacturing/formulation/rational-selection-of-sugars-for-biotherapeutic-stabilization-a-practitioners-perspective/ [retrieved on 2021-03-08], page 4 of 20, first four lines

WANG W. ET AL.: "ANTIBODY STRUCTURE, INSTABILITY, AND FORMULATION", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY AND AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, US, vol. 96, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1-26, XP009084505, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/JPS.20727, page 17, right-hand column

BRUCE A. KERWIN: "Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 97, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 2924-2935, XP055015864, US ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.21190, the whole document

DIANA GIL ET AL.: "Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments", ADVANCES IN BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, vol. 4, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 73-84, XP055325678, ISSN: 2156-8456, DOI: 10.4236/abb.2013.44A011

(57) Изобретение относится к стабильным жидким фармацевтическим составам, содержащим биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека. В отдельных вариантах осуществления составы помимо биспецифичного антитела содержат буфер, поверхностно-активное вещество и сахар. Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению демонстрируют значительный уровень стабильности антитела в стрессовых условиях и при хранении.



белковой области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), где A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности соответственно, SEQ ID NO: 7, 8 и 9, A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, соответственно, SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности соответственно, SEQ ID NO: 13, 14 и 15; (b) буфер, содержащий гистидин; (c) органический соразтворитель, содержащий полисорбат; и (d) стабилизатор, содержащий сахар; где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет от 1 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл до 200 мг/мл  $\pm 20$  мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет 2 мг/мл  $\pm 0,2$  мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет 20 мг/мл  $\pm 2$  мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет 80 мг/мл  $\pm 8$  мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет 100 мг/мл  $\pm 10$  мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет 160 мг/мл  $\pm 16$  мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация гистидинового буфера составляет от 5 мМ  $\pm 1$  мМ до 15 мМ  $\pm 3$  мМ. В некоторых случаях концентрация гистидинового буфера составляет 10 мМ  $\pm 1$  мМ. В некоторых вариантах осуществления гистидиновый буфер содержит L-гистидин и моногидрат моногидрохлорида L-гистидина. В некоторых случаях концентрация L-гистидина составляет 3,65 мМ  $\pm 0,5$  мМ, а концентрация моногидрата моногидрохлорида L-гистидина составляет 6,35 мМ  $\pm 0,5$  мМ. В некоторых случаях гистидиновый буфер содержит 0,57  $\pm 0,05$  мг/мл L-гистидина и 1,33  $\pm 0,13$  мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина.

В некоторых вариантах осуществления концентрация полисорбата составляет от 0,01%  $\pm 0,005\%$  до 0,5%  $\pm 0,25\%$  (мас./об.). В некоторых случаях концентрация полисорбата составляет 0,1%  $\pm 0,05\%$  (мас./об.). В некоторых случаях концентрация полисорбата составляет 0,1  $\pm 0,01\%$  (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления полисорбат представляет собой полисорбат 80.

В некоторых вариантах осуществления сахар представляет собой сахарозу. В некоторых случаях концентрация сахарозы составляет от 5%  $\pm 1\%$  до 20%  $\pm 4\%$  (мас./об.). В некоторых случаях концентрация сахарозы составляет от 8%  $\pm 0,5\%$  до 12%  $\pm 0,5\%$  (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления концентрация сахарозы составляет 10%  $\pm 1\%$  (мас./об.).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 2 мг/мл  $\pm 0,2$  мг/мл антитела, (b) от 5 мМ  $\pm 1$  мМ до 15 мМ  $\pm 3$  мМ гистидинового буфера, (c) от 0,01%  $\pm 0,005\%$  до 0,5%  $\pm 0,25\%$  (мас./об.) полисорбата и (d) от 5%  $\pm 1\%$  до 20%  $\pm 4\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 2 мг/мл  $\pm 0,2$  мг/мл антитела, (b) 10 мМ  $\pm 1$  мМ гистидинового буфера, (c) 0,1%  $\pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата и (d) 10%  $\pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 2 мг/мл  $\pm 0,2$  мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ  $\pm 0,2$  мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ  $\pm 0,2$  мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1%  $\pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата и (e) 10%  $\pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 2 мг/мл  $\pm 0,2$  мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm 0,05$  мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm 0,13$  мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1%  $\pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата и (e) 10%  $\pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 20 мг/мл  $\pm 2$  мг/мл антитела, (b) от 5 мМ  $\pm 1$  мМ до 15 мМ  $\pm 3$  мМ гистидинового буфера, (c) от 0,01%  $\pm 0,005\%$  до 0,5%  $\pm 0,25\%$  (мас./об.) полисорбата и (d) от 5%  $\pm 1\%$  до 20%  $\pm 4\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 20 мг/мл  $\pm 2$  мг/мл антитела, (b) 10 мМ  $\pm 1$  мМ гистидинового буфера, (c) 0,1%  $\pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата и (d) 10%  $\pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 20 мг/мл  $\pm 2$  мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ  $\pm 0,2$  мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ  $\pm 0,2$  мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1%  $\pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата и (e) 10%  $\pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 20 мг/мл  $\pm 2$  мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm 0,05$  мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm 0,13$  мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1%  $\pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата и (e) 10%  $\pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 80 мг/мл  $\pm 8$

мг/мл антитела, (b) от 5 мМ ± 1 мМ до 15 мМ ± 3 мМ гистидинового буфера, (c) от 0,01% ± 0,005% до 0,5% ± 0,25% (мас./об.) полисорбата и (d) от 5% ± 1% до 20% ± 4% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 80 мг/мл ± 8 мг/мл антитела, (b) 10 мМ ± 1 мМ гистидинового буфера, (c) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (d) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 80 мг/мл ± 8 мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ ± 0,2 мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ ± 0,2 мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (e) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 80 мг/мл ± 8 мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл ± 0,05 мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл ± 0,13 мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (e) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 100 мг/мл ± 10 мг/мл антитела, (b) от 5 мМ ± 1 мМ до 15 мМ ± 3 мМ гистидинового буфера, (c) от 0,01% ± 0,005% до 0,5% ± 0,25% (мас./об.) полисорбата и (d) от 5% ± 1% до 20% ± 4% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 100 мг/мл ± 10 мг/мл антитела, (b) 10 мМ ± 1 мМ гистидинового буфера, (c) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (d) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 100 мг/мл ± 10 мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ ± 0,2 мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ ± 0,2 мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (e) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 100 мг/мл ± 10 мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл ± 0,05 мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл ± 0,13 мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (e) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 160 мг/мл ± 16 мг/мл антитела, (b) от 5 мМ ± 1 мМ до 15 мМ ± 3 мМ гистидинового буфера, (c) от 0,01% ± 0,005% до 0,5% ± 0,25% (мас./об.) полисорбата и (d) от 5% ± 1% до 20% ± 4% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 160 мг/мл ± 16 мг/мл антитела, (b) 10 мМ ± 1 мМ гистидинового буфера, (c) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (d) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 160 мг/мл ± 16 мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ ± 0,2 мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ ± 0,2 мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (e) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) 160 мг/мл ± 16 мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл ± 0,05 мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл ± 0,13 мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 0,1% ± 0,01% (мас./об.) полисорбата и (e) 10% ± 1% (мас./об.) сахарозы, при pH 5,8 ± 0,3.

В любом из этих вариантов осуществления полисорбат может представлять собой полисорбат 80.

В различных вариантах осуществления фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, по меньшей мере 90% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C, по данным эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-СВЭЖХ). В некоторых случаях по меньшей мере 93% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C, по данным SE-СВЭЖХ. В некоторых случаях по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C, по данным SE-СВЭЖХ.

В различных вариантах осуществления фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ. В некоторых случаях по меньшей мере 97% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ.

В различных вариантах осуществления фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ. В некоторых случаях по меньшей мере 98% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ.

В различных вариантах осуществления фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, состав содержит не более 6% высокомолекулярных (ВМ) соединений после 1 месяца хранения при 45°C, по данным SE-СВЭЖХ. В некоторых случаях состав содержит не более 5,6% ВМ соединений после 1 месяца хранения при 45°C, по данным SE-СВЭЖХ.

В различных вариантах осуществления фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, состав содержит не более 2% ВМ соединений после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ. В некоторых случаях состав содержит не более 1% ВМ соединений после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ.

В различных вариантах осуществления фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, состав содержит не более 1,5% ВМ соединений после 3 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ. В некоторых случаях состав содержит не более 1% ВМ соединений после 9 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ.

В различных вариантах осуществления любой из фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, антитело содержит A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно, SEQ ID NO: 7, 8 и 9; A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно, SEQ ID NO: 10, 11 и 12; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно, SEQ ID NO: 13, 14 и 15.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и LCVR, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и LCVR, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и LCVR, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и LCVR, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и LCVR, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и LCVR, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.

В различных вариантах осуществления любой из фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, присоединенную, соответственно, к HCVR каждого из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена. В некоторых случаях константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1. В некоторых случаях константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG4. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи, присоединенная к HCVR первого антигенсвязывающего домена, или константная область тяжелой цепи, присоединенная к HCVR второго антигенсвязывающего домена, но не обе из них, содержит аминокислотную модификацию, снижающую связывание белка А по сравнению с тяжелой цепью того же изотипа без указанной модификации. В некоторых случаях модификация включает замену H435R (нумерация EU) в тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG4. В некоторых случаях модификация включает замену H435R и замену Y436F (нумерация EU) в тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит химерный шарнир. Например, химерный шарнир содержит в одном варианте осуществления первую аминокислотную последовательность или "верхнюю шарнирную" последовательность, полученную из шарнирной области IgG1 человека или шарнирной области IgG4 человека, и вторую аминокислотную последовательность или "нижнюю шарнирную" последовательность, полученную из шарнирной области IgG2 человека. В отдельных вариантах осуществления первая или "верхняя шарнирная" последовательность содержит аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления вторая или "нижняя шарнирная" последовательность содержит аминокислотные остатки в положениях с 228 по 236 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых случаях, когда константная область тяжелой цепи антитела относится к изотипу IgG4, химерный шарнир содержит верхнюю шарнирную последовательность из IgG4 человека (положения с 216 по 227 в соответствии с нумерацией EU) и нижнюю шарнирную последовательность из IgG2 человека (положения с 228 по 236 в соответствии с нумерацией EU). В некоторых случаях, когда константная область тяжелой цепи антитела относится к изотипу IgG1, химерный шарнир содержит верхнюю шарнирную последовательность из IgG1 человека (положения с 216 по

227 в соответствии с нумерацией EU) и нижнюю шарнирную последовательность из IgG2 человека (положения с 228 по 236 в соответствии с нумерацией EU). В некоторых вариантах осуществления, когда константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1, а антитело содержит химерный шарнир, домен CH2 константной области тяжелой цепи, в остальном имеющей изотип IgG1, относится к изотипу IgG4. Если не указано иное, упоминания константной области тяжелой цепи IgG1 или IgG4 включают константные области тяжелой цепи, содержащие химерный шарнир (например, верхнюю шарнирную последовательность IgG1 или IgG4, соответственно, и нижнюю шарнирную последовательность IgG2). Например, упоминание константной области тяжелой цепи IgG1 включает константную область тяжелой цепи IgG1, которая содержит нижнюю шарнирную последовательность IgG2, а упоминание константной области тяжелой цепи IgG4 включает константную область тяжелой цепи IgG4, которая содержит нижнюю шарнирную последовательность IgG2.

В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17, 18 и 19. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В различных вариантах осуществления любой из фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую HCVR первого антигенсвязывающего домена, и вторую тяжелую цепь, содержащую HCVR второго антигенсвязывающего домена, где первая тяжелая цепь содержит остатки 1-452 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, а вторая тяжелая цепь содержит остатки 1-448 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит общую легкую цепь, содержащую LCVR первого и второго антигенсвязывающих доменов, где общая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В различных вариантах осуществления любой из фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую HCVR первого антигенсвязывающего домена, и вторую тяжелую цепь, содержащую HCVR второго антигенсвязывающего домена, причем первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит общую легкую цепь, содержащую LCVR первого и второго антигенсвязывающих доменов, где общая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический состав, содержащий: (a) 2 мг/мл  $\pm$  0,2 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (b) 10 мМ  $\pm$  1 мМ гистидинового буфера, pH 5,8  $\pm$  0,2, (c) 0,1%  $\pm$  0,01% (мас./об.) полисорбата 80 и (d) 10%  $\pm$  1% (мас./об.) сахарозы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 2 мг/мл  $\pm$  0,2 мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ  $\pm$  0,2 мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ  $\pm$  0,2 мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина и (d) 0,1%  $\pm$  0,01% (мас./об.) полисорбата 80, в воде при pH 5,8  $\pm$  0,2. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 2 мг/мл  $\pm$  0,2 мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл полисорбата 80 и (e) 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл сахарозы, в воде при pH 5,8  $\pm$  0,2.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический состав, содержащий: (a) 20 мг/мл  $\pm$  2 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (b) 10 мМ  $\pm$  1 мМ гистидинового буфера, pH 5,8  $\pm$  0,2, (c) 0,1%  $\pm$  0,01% (мас./об.) полисорбата 80 и (d) 10%  $\pm$  1% (мас./об.) сахарозы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 20 мг/мл  $\pm$  2 мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ  $\pm$  0,2 мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ  $\pm$  0,2 мМ моногидрата моногидрохлорида L-

гистидина и (d)  $0,1\% \pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата 80, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ . В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 20 мг/мл  $\pm 2$  мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 1 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл полисорбата 80 и (e) 100 мг/мл  $\pm 10$  мг/мл сахарозы, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ .

В одном аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический состав, содержащий: (a) 80 мг/мл  $\pm 8$  мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (b) 10 мМ  $\pm 1$  мМ гистидинового буфера, pH  $5,8 \pm 0,2$ , (c)  $0,1\% \pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата 80 и (d)  $10\% \pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 80 мг/мл  $\pm 8$  мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ  $\pm 0,2$  мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ  $\pm 0,2$  мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина и (d)  $0,1\% \pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата 80, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ . В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 80 мг/мл  $\pm 8$  мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 1 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл полисорбата 80 и (e) 100 мг/мл  $\pm 10$  мг/мл сахарозы, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ .

В одном аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтический состав, содержащий: (a) 100 мг/мл  $\pm 10$  мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (b) 10 мМ  $\pm 1$  мМ гистидинового буфера, pH  $5,8 \pm 0,2$ , (c)  $0,1\% \pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата 80 и (d)  $10\% \pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 100 мг/мл  $\pm 10$  мг/мл антитела, (b) 3,65 мМ  $\pm 0,2$  мМ L-гистидина, (c) 6,35 мМ  $\pm 0,2$  мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина и (d)  $0,1\% \pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата 80, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ . В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав состоит из: (a) 100 мг/мл  $\pm 10$  мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 1 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл полисорбата 80 и (e) 100 мг/мл  $\pm 10$  мг/мл сахарозы, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ .

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит: (a) от 1 до 200 мг/мл антитела (как обсуждается выше или далее в настоящем документе); (b) буфер, содержащий ацетат или фосфат; (c) органический соразтворитель, содержащий полисорбат; и (d) стабилизатор, содержащий сахар; где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ . В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит: (a) от 1 до 200 мг/мл антитела (например, 2 мг/мл, 20 мг/мл, 80 мг/мл или 100 мг/мл), (b) от 1 до 50 мМ ацетатного или фосфатного буфера и (d)  $0,1\% \pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата 80, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ .

В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, где композиция содержит фармацевтический состав, как обсуждается выше или далее в настоящем документе, и композиция содержится в контейнере. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой флакон. В некоторых случаях флакон представляет собой флакон I типа из прозрачного стекла объемом 2 мл, 5 мл, 10 мл или 20 мл. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой шприц. В некоторых случаях шприц изготовлен из стекла с низким содержанием вольфрама. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. В некоторых вариантах осуществления композиция содержится в автоиньекторе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен набор, включающий (i) контейнер, содержащий композицию, содержащую фармацевтический состав, как обсуждается выше или далее в настоящем документе, и инструкции по применению композиции. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой стеклянный флакон. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой автоиньектор. В некоторых случаях в инструкциях содержится информация о подкожном введении композиции. В некоторых случаях в инструкциях содержится информация о внутривенном введении композиции.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен контейнер, необязательно представляющий собой стеклянный флакон, содержащий 2 мг антитела в стабильном составе, где состав содержит (a) 2 мг/мл  $\pm 0,2$  мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm 0,1$  мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm 0,1$

мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл полисорбата 80 и (e) 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл сахарозы, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ . В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен контейнер, необязательно представляющий собой стеклянный флакон, содержащий 20 мг, 80 мг или 160 мг антитела в стабильном составе, где состав содержит (a) 20 мг/мл  $\pm$  2 мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл полисорбата 80 и (e) 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл сахарозы, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ . В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен контейнер, необязательно представляющий собой стеклянный флакон, содержащий 100 мг, 200 мг или 400 мг антитела в стабильном составе, где состав содержит (a) 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл антитела, (b) 0,57 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл L-гистидина, (c) 1,33 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл моногидрата моногидрохлорида L-гистидина, (d) 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл полисорбата 80 и (e) 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл сахарозы, в воде при pH  $5,8 \pm 0,2$ .

В одном аспекте настоящего изобретения предложена единичная лекарственная форма, содержащая фармацевтический состав, как обсуждается выше или далее в настоящем документе, где антитело присутствует в количестве от 0,1 до 500 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 2 до 2,5 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 10 до 11 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 20 до 25 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 80 до 90 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 100 до 125 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 160 до 180 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 190 до 210 мг. В некоторых случаях антитело присутствует в количестве от 320 до 360 мг. В некоторых вариантах осуществления единичная лекарственная форма представляет собой стеклянный флакон. В некоторых вариантах осуществления единичная лекарственная форма представляет собой предварительно заполненный шприц. В некоторых вариантах осуществления единичная лекарственная форма представляет собой автоинъектор.

В любых из фармацевтических композиций, наборов или единичных лекарственных форм, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, контейнер, содержащий фармацевтический состав, может иметь свободное пространство, содержащее газ, где газ содержит менее 5 об.% кислорода. В некоторых случаях газ содержит менее 1 об.% кислорода. В некоторых случаях газ содержит не более 0,1 об.% кислорода.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, где композиция содержит фармацевтический состав, как обсуждается выше или далее в настоящем документе. В некоторых случаях контейнер представляет собой шприц. В некоторых случаях контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. В некоторых случаях контейнер представляет собой автоинъектор. В некоторых случаях контейнер представляет собой стеклянный флакон.

В различных вариантах осуществления любые признаки или компоненты вариантов осуществления, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, можно комбинировать, и указанные комбинации включены в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или далее в настоящем документе, может быть комбинировано с другим взаимосвязанным значением, обсуждаемым выше или далее в настоящем документе, для определения диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны и все значения, входящие в такие диапазоны, включены в объем настоящего изобретения. Каждое из значений, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, может быть указано с отклонением в 1, 5, 10 или 20%. Например, концентрация 10 мМ может быть указана как  $10 \text{ мМ} \pm 0,1 \text{ мМ}$  (отклонение в 1%),  $10 \text{ мМ} \pm 0,5 \text{ мМ}$  (отклонение в 5%),  $10 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$  (отклонение в 10%) или  $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$  (отклонение в 20%).

Другие варианты осуществления будут ясны после ознакомления со следующим далее подробным описанием изобретения.

### **Подробное описание изобретения**

Обращаясь к описанию настоящего изобретения, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, так как указанные способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания частных вариантов осуществления и не подразумевает ограничительного характера, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, обычно понимаемые специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В контексте настоящего документа термин "приблизительно", когда он используется для описания конкретного указанного численного значения или диапазона значений, означает, что значение может отклоняться от указанного значения не более чем на 1%. Например, в контексте настоящего документа выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем

документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, иллюстративные методы и материалы описаны далее. Содержание всех патентов, заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании, включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

#### **Фармацевтические составы**

В контексте настоящего документа выражение "фармацевтический состав" означает комбинацию по меньшей мере одного активного ингредиента (например, биспецифичного антитела против CD20хCD3, которое может оказывать биологический эффект у человека или животного, не являющегося человеком) и по меньшей мере одного неактивного ингредиента, который после объединения с активным ингредиентом и/или одним или более дополнительными неактивными ингредиентами подходит для терапевтического введения человеку или животному, не являющемуся человеком. Термин "состав" в контексте настоящего документа означает "фармацевтический состав", если отдельно не указано иное. В настоящем изобретении предложены фармацевтические составы, содержащие по меньшей мере один терапевтический полипептид. Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения терапевтический полипептид представляет собой биспецифичное антитело, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент. Более конкретно, настоящее изобретение включает фармацевтические составы, которые содержат: (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека; (ii) буфер, содержащий гистидин; (iii) органический соразтворитель, содержащий полисорбат; и (iv) стабилизатор, содержащий сахар. В составы согласно настоящему изобретению могут быть включены дополнительные компоненты, если такие компоненты значимо не ухудшают стабильность состава. Конкретные примеры компонентов и составов, входящих в объем настоящего изобретения, подробно описаны ниже.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению в отдельных вариантах осуществления могут представлять собой текучие составы. В контексте настоящего документа выражение "текучий состав" означает смесь по меньшей мере двух компонентов, которая существует преимущественно в текучем состоянии при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 45°C. Текучие составы включают, среди прочего, жидкие составы. Текучие составы могут иметь низкую, среднюю или высокую вязкость в зависимости от их конкретных компонентов.

#### **Биспецифичные антитела, специфично связывающие CD20 человека и CD3 человека**

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению могут содержать биспецифичное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека.

В целом подразумевается, что термин "антитело" в контексте настоящего документа относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидные цепи - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями, а также их мультимерам (например, IgM); тем не менее, молекулы иммуноглобулина, состоящие только из тяжелых цепей (т.е. в которых отсутствуют легкие цепи), также включены в определение термина "антитело". Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемыми определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В отдельных вариантах осуществления изобретения биспецифичные антитела против CD20хCD3 согласно изобретению являются антителами человека. Под термином "антитело человека" в контексте настоящего документа подразумеваются антитела, вариабельные и константные области которых получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и, в частности, в CDR3. Тем не менее, термин "антитело человека" в контексте настоящего документа не подразумевает под собой антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, привиты на каркасные последовательности человека. В различных вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20хCD3 представляет собой антитело IgG человека. В различных вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20хCD3 представляет собой антитело человека изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или смешанного изотипа. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20хCD3 представляет собой антитело IgG1 человека (т.е. антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека, присоединенную, соответственно, к HCVR каждого из первого антигенсвязывающего домена и

второго антигенсвязывающего домена). В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 представляет собой антитело IgG4 человека (т.е. антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG4 человека, присоединенную, соответственно, к HCVR каждого из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена). В любом из вариантов осуществления, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, биспецифичное антитело против CD20xCD3 может содержать легкую каппа-цепь человека. В любом из вариантов осуществления, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, биспецифичное антитело против CD20xCD3 может содержать легкую лямбда-цепь человека.

В любых вариантах осуществления биспецифичное антитело может включать модификацию одной или обеих тяжелых цепей для облегчения очистки биспецифичного антитела (т.е. гетеродимера) от гомодимерных примесей. В некоторых вариантах осуществления биспецифичные антитела включают первую и вторую тяжелые цепи (т.е. тяжелую цепь CD20-связывающего плеча и тяжелую цепь CD3-связывающего плеча), которые являются идентичными (например, обе относятся к изотипу IgG1 или IgG4), за исключением модификации в домене CH3 одной или другой тяжелой цепи, снижающей связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с антителом без указанной модификации. В некоторых случаях домен CH3 первой тяжелой цепи (например, CD20-связывающего плеча) связывает белок А, а домен CH3 второй тяжелой цепи (например, CD3-связывающего плеча) содержит мутацию, снижающую или устраняющую связывание белка А. В некоторых случаях мутация представляет собой модификацию H435R (по нумерации EU; H95R по нумерации экзонов IMGT). В некоторых случаях мутация представляет собой модификацию H435R (по нумерации EU; H95R по нумерации экзонов IMGT) и модификацию Y436F (по нумерации EU; Y96F по IMGT). Другие модификации, которые могут содержаться во втором домене CH3, включают: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I по IMGT) в случае доменов CH3 IgG1; и Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I по IMGT) в случае доменов CH3 IgG4.

В любых вариантах осуществления биспецифичное антитело может включать химерный шарнир. Подразумевается, что термин "химерный шарнир" включает химерный белок, содержащий первую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области одной молекулы Ig, и вторую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области другого класса или подкласса молекулы Ig. Например, химерный шарнир содержит в одном варианте осуществления первую аминокислотную последовательность или "верхнюю шарнирную" последовательность, полученную из шарнирной области IgG1 человека или шарнирной области IgG4 человека, и вторую аминокислотную последовательность или "нижнюю шарнирную" последовательность, полученную из шарнирной области IgG2 человека. В отдельных вариантах осуществления первая или "верхняя шарнирная" последовательность содержит аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления вторая или "нижняя шарнирная" последовательность содержит аминокислотные остатки в положениях с 228 по 236 в соответствии с нумерацией EU.

Антитела согласно изобретению могут в некоторых вариантах осуществления представлять собой рекомбинантные антитела человека. Подразумевается, что термин "рекомбинантное антитело человека" в контексте настоящего документа включает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными методами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, антитела, выделенные от трансгенного животного (например, мыши), имеющего гены иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Тем не менее, в отдельных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования трансгенного животного, имеющего последовательности Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> зародышевой линии человека и родственны им, не могут в природе существовать в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Термины "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела (или просто "часть антитела" или "фрагмент антитела") в контексте настоящего документа относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с CD20 человека или CD3 человека.

Под "выделенным антителом" в контексте настоящего документа подразумевается антитело, которое по существу не содержит другие антитела, имеющие отличающиеся антигенные специфичности (например, выделенное биспецифичное антитело, которое специфично связывает CD20 человека и CD3 че-

ловека, по существу не содержит антител, которые специфично связывают антигены, отличные от CD20 человека и CD3 человека).

Термин "специфично связывает" и т.д. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфичное связывание может быть охарактеризовано константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М или более. Способы определения того, являются ли две молекулы специфично связывающимися, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Выделенное антитело, которое специфично связывает CD20 человека и CD3 человека, может, тем не менее, обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы CD20 или CD3 от других видов (ортологи). В контексте настоящего изобретения считается, что мультиспецифичные (например, биспецифичные) антитела, которые связываются с CD20 человека и CD3 человека, а также одним или более дополнительных антигенов, "специфично связывают" CD20 человека и CD3 человека. Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Примеры биспецифичных антител против CD20xCD3, которые могут быть включены в фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, приведены в публикации WO 2014/047231, содержание которой включено в полном объеме посредством ссылки.

Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения биспецифичное антитело против CD20xCD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9, а второй антигенсвязывающий домен содержит CDR тяжелой цепи A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12. Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения биспецифичное антитело против CD20xCD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит общие (для первого и второго антигенсвязывающих доменов) определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15.

В отдельных вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В отдельных вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит общую вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В отдельных вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4/6, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5/6. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG1 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело против CD20xCD3 содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и общую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. Иллюстративное биспецифичное антитело против CD20xCD3 с первым антигенсвязывающим доменом, который специфично связывает CD20 человека и содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека и содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, обозначается в настоящем документе REGN1979. В некоторых вариантах осуществления биспе-

цифичное антитело имеет первую тяжелую цепь (включая HCVR, которая специфично связывает CD20 человека), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, вторую тяжелую цепь (включая HCVR, которая специфично связывает CD3 человека), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и общую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях зрелая форма антитела может не включать C-концевые остатки лизина из SEQ ID NO: 1 и 2. Таким образом, в некоторых случаях CD20-связывающее плечо антитела содержит тяжелую цепь, содержащую остатки 1-452 SEQ ID NO: 1, и CD3-связывающее плечо антитела содержит тяжелую цепь, содержащую остатки 1-448 SEQ ID NO: 2.

Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащееся в фармацевтических составах согласно настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных свойств, которыми должны обладать составы, а также конкретных обстоятельств и целей, для которых предполагается применять составы. В отдельных вариантах осуществления фармацевтические составы могут содержать от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 мг/мл антитела; от приблизительно 0,5 до приблизительно 400 мг/мл антитела; от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/мл антитела; от приблизительно 2 до приблизительно 100 мг/мл; от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/мл антитела; от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/мл антитела; от приблизительно 75 до приблизительно 125 мг/мл; от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/мл или от приблизительно 2 до приблизительно 160 мг/мл антитела. Например, составы согласно настоящему изобретению могут представлять собой жидкие составы, которые содержат приблизительно 0,5 мг/мл; приблизительно 1 мг/мл; приблизительно 2 мг/мл; приблизительно 3 мг/мл; приблизительно 4 мг/мл; приблизительно 5 мг/мл; приблизительно 6 мг/мл; приблизительно 7 мг/мл; приблизительно 8 мг/мл; приблизительно 9 мг/мл; приблизительно 10 мг/мл; приблизительно 11 мг/мл; приблизительно 12 мг/мл; приблизительно 13 мг/мл; приблизительно 14 мг/мл; приблизительно 15 мг/мл; приблизительно 16 мг/мл; приблизительно 17 мг/мл; приблизительно 18 мг/мл; приблизительно 19 мг/мл; приблизительно 20 мг/мл; приблизительно 21 мг/мл; приблизительно 22 мг/мл; приблизительно 23 мг/мл; приблизительно 24 мг/мл; приблизительно 25 мг/мл; приблизительно 26 мг/мл; приблизительно 27 мг/мл; приблизительно 28 мг/мл; приблизительно 29 мг/мл; приблизительно 30 мг/мл; приблизительно 35 мг/мл; приблизительно 40 мг/мл; приблизительно 45 мг/мл; приблизительно 50 мг/мл; приблизительно 55 мг/мл; приблизительно 60 мг/мл; приблизительно 65 мг/мл; приблизительно 70 мг/мл; приблизительно 75 мг/мл; приблизительно 80 мг/мл; приблизительно 85 мг/мл; приблизительно 90 мг/мл; приблизительно 95 мг/мл; приблизительно 96 мг/мл; приблизительно 97 мг/мл; приблизительно 98 мг/мл; приблизительно 99 мг/мл; приблизительно 100 мг/мл; приблизительно 101 мг/мл; приблизительно 102 мг/мл; приблизительно 103 мг/мл; приблизительно 104 мг/мл; приблизительно 105 мг/мл; приблизительно 110 мг/мл; приблизительно 115 мг/мл; приблизительно 120 мг/мл; приблизительно 125 мг/мл; приблизительно 130 мг/мл; приблизительно 135 мг/мл; приблизительно 140 мг/мл; приблизительно 145 мг/мл; приблизительно 150 мг/мл; приблизительно 155 мг/мл; приблизительно 160 мг/мл; приблизительно 165 мг/мл; приблизительно 170 мг/мл; приблизительно 175 мг/мл; приблизительно 180 мг/мл; приблизительно 185 мг/мл; приблизительно 190 мг/мл; приблизительно 195 мг/мл; или приблизительно 200 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое(ый) специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека. В отдельных вариантах осуществления фармацевтические составы представляют собой жидкие составы, которые могут содержать от  $1 \pm 0,1$  мг/мл до  $200 \pm 20$  мг/мл антитела; от  $2 \pm 0,2$  мг/мл до  $100 \pm 10$  мг/мл антитела; от  $1 \pm 0,5$  мг/мл до  $30 \pm 5$  мг/мл антитела; от  $10 \pm 1$  мг/мл до  $30 \pm 3$  мг/мл антитела; от  $1 \pm 0,1$  мг/мл до  $3 \pm 0,3$  мг/мл антитела; от  $15 \pm 1,5$  мг/мл до  $25 \pm 2,5$  мг/мл антитела; от  $90 \pm 5$  мг/мл до  $110 \pm 5$  мг/мл антитела или от  $150 \pm 7,5$  мг/мл до  $170 \pm 7,5$  мг/мл антитела. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат  $2 \pm 0,2$  мг/мл антитела. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат  $20 \pm 2$  мг/мл антитела. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат  $80 \pm 8$  мг/мл антитела. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат  $100 \pm 10$  мг/мл антитела.

#### **Биоэквиваленты**

Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от иллюстративных молекул, раскрытых в настоящем документе, но сохраняют способность связывать CD20 человека и CD3 человека. Такие вариантные молекулы могут содержать одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности антител, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, биоэквивалентные любому из иллюстративных антител, представленных в настоящем документе. Два антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значимой разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в разовой дозе, так и в многократных дозах. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и, тем не

менее, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначимыми для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

В одном из вариантов осуществления два антитела являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

В одном из вариантов осуществления два антитела являются биоэквивалентными, если пациент может один или несколько раз быть переведен с референсного продукта на биологический продукт и наоборот без ожидаемого увеличения риска нежелательных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности, или уменьшения эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого перевода.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Способы оценки биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором измеряют динамику концентрации антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости; (b) тест *in vitro*, который был соотнесен с данными о биодоступности у людей *in vivo* и позволяет в разумных пределах их прогнозировать; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором измеряют краткосрочную динамику соответствующего фармакологического действия антитела (или его мишени) и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, в котором устанавливается безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

#### **Вспомогательные вещества для состава и pH**

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению содержат одно или более вспомогательных веществ. Термин "вспомогательное вещество" в контексте настоящего документа обозначает любой нетерапевтический агент, добавляемый в состав для обеспечения желаемой консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта.

В отдельных вариантах осуществления фармацевтические составы согласно настоящему изобретению имеют вязкость менее 15 сП, что является благоприятным для доставки композиций из предварительно заполненного шприца или автоинъектора. В некоторых случаях фармацевтические составы имеют вязкость менее 14 сП, менее 13 сП, менее 12 сП, менее 11 сП, менее 10 сП, менее 9 сП, менее 8 сП, менее 7 сП, менее 6 сП, менее 5 сП, менее 4 сП, менее 3 сП, менее 2 сП или менее 1,5 сП при 20°C при измерении с использованием капиллярного вискозиметра (например, как описано в примере 3). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы имеют вязкость менее 15 сП при концентрациях антитела до 150 мг/мл при 20°C при измерении с использованием капиллярного вискозиметра (например, как описано в примере 3). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы имеют вязкость менее 5 сП при концентрациях антитела до 100 мг/мл при 20°C при измерении с использованием капиллярного вискозиметра (например, как описано в примере 3). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы имеют вязкость менее 2 сП при концентрациях антитела до 20 мг/мл при 20°C при измерении с использованием капиллярного вискозиметра (например, как описано в примере 3).

В отдельных вариантах осуществления фармацевтические составы согласно настоящему изобретению содержат один или более углеводов, например, один или более сахаров. Сахар может представлять собой восстанавливающий сахар или невосстанавливающий сахар. "Восстанавливающие сахара" включают, например, сахара с кетонной или альдегидной группой, которые содержат реакционноспособную гемиацетальную группу, которая обеспечивает действие сахара в качестве восстановителя. Конкретные примеры восстанавливающих сахаров включают фруктозу, глюкозу, глицеральдегид, лактозу, арабинозу, маннозу, ксилозу, рибозу, рамнозу, галактозу и мальтозу. Невосстанавливающие сахара могут содержать аномерный атом углерода, который является ацеталем и по существу не вступает во взаимодействие с аминокислотами или полипептидами для инициирования реакции Майяра. Конкретные примеры невосстанавливающих сахаров включают сахарозу, трегалозу, сорбозу, сукралозу, мелицитозу и раффинозу. Сахарные кислоты включают, например, сахаристые кислоты, глюконат и другие полигидроксисахара и их соли. В некоторых вариантах осуществления сахар представляет собой сахарозу. В некоторых случаях сахар (например, сахароза) выступает в качестве термического стабилизатора для биспецифичного антитела против CD20×CD3.

Количество сахара (например, сахарозы), содержащееся в фармацевтических составах согласно настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных обстоятельств и целей, для которых предполагается применять составы. В отдельных вариантах осуществления составы могут содержать от приблизительно 0,1 до приблизительно 20% сахара; от приблизительно 0,5 до приблизительно 20% сахара; от приблизительно 1 до приблизительно 20% сахара; от приблизительно 2 до приблизительно 15% сахара; от приблизительно 5 до приблизительно 15% сахара; от приблизительно 7,5 до приблизительно 12,5% сахара или от приблизительно 9 до приблизительно 11% сахара. Например, фармацевтические составы согласно настоящему изобретению могут содержать приблизительно 0,5%; приблизительно 1,0%; приблизительно 1,5%; приблизительно 2,0%; приблизительно 2,5%; приблизительно

3,0%; приблизительно 3,5%; приблизительно 4,0%; приблизительно 4,5%; приблизительно 5,0%; приблизительно 5,5%; приблизительно 6,0%; приблизительно 6,5%; приблизительно 7,0%; приблизительно 7,5%; приблизительно 8,0%; приблизительно 8,5%; приблизительно 9,0%; приблизительно 9,5%; приблизительно 10,0%; приблизительно 10,5%; приблизительно 11,0%; приблизительно 11,5%; приблизительно 12,0%; приблизительно 12,5%; приблизительно 13,0%; приблизительно 13,5%; приблизительно 14,0%; приблизительно 14,5%; приблизительно 15% или приблизительно 20% сахара (например, сахарозы). В некоторых вариантах осуществления составы содержат приблизительно 10% сахара (например, сахарозы). Каждое из процентных значений, указанных выше, соответствует проценту по массе/объему (мас./об.). В некоторых случаях составы содержат от  $5\% \pm 1\%$  до  $20\% \pm 4\%$  (мас./об.) сахарозы. В некоторых случаях составы содержат от  $8\% \pm 0,5\%$  до  $12\% \pm 0,5\%$  (мас./об.) сахарозы. В некоторых случаях составы содержат  $10\% \pm 1\%$  (мас./об.) сахарозы.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению также могут содержать один или более органических сорастворителей (или стабилизаторов границы раздела фаз) такого типа и в таком количестве, которые обеспечивали бы стабилизацию биспецифичного антитела против CD20×CD3 в условиях неосторожного обращения или перемешивания, например, на орбитальном шейкере. В некоторых вариантах осуществления органический сорастворитель представляет собой поверхностно-активное вещество. В контексте настоящего документа термин "поверхностно-активное вещество" означает вещество, которое снижает поверхностное натяжение жидкости, в которой оно растворено, и/или снижает натяжение на границе раздела между маслом и водой. Поверхностно-активные вещества могут быть ионогенными или неионогенными. Примеры неионогенных поверхностно-активных веществ, которые могут быть включены в составы согласно настоящему изобретению, включают, например, алкилполи(этиленоксид), алкилполиглюкозиды (например, октилглюкозид и децилмальтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид МЭА (кокамид моноэтаноламин), кокамид ДЭА (кокамид диэтаноламин) и кокамид ТЭА (кокамид триэтаноламин). Конкретные неионогенные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в составы согласно настоящему изобретению, включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; поллоксамеры, такие как поллоксамер 188 (также называемый Pluronic F68), поллоксамер 407; полиэтилен-полипропиленгликоль; или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полисорбат 20 также известен как TWEEN 20, сорбитана монолаурат и полиоксиэтиленсорбитана монолаурат. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

Количество поверхностно-активного вещества, содержащееся в фармацевтических составах согласно настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных свойств, которыми должны обладать составы, а также конкретных обстоятельств и целей, для которых предполагается применять составы. В отдельных вариантах осуществления составы могут содержать от приблизительно 0,01 до приблизительно 1% поверхностно-активного вещества; от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,5% поверхностно-активного вещества; от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,15%; от приблизительно 0,08 до приблизительно 0,12% поверхностно-активного вещества; или от приблизительно 0,09 до приблизительно 0,11% поверхностно-активного вещества. Например, составы согласно настоящему изобретению могут содержать приблизительно 0,01%; приблизительно 0,02%; приблизительно 0,03%; приблизительно 0,04%; приблизительно 0,05%; приблизительно 0,06%; приблизительно 0,07%; приблизительно 0,08%; приблизительно 0,09%; приблизительно 0,10%; приблизительно 0,11%; приблизительно 0,12%; приблизительно 0,13%; приблизительно 0,14%; приблизительно 0,15%; приблизительно 0,16%; приблизительно 0,17%; приблизительно 0,18%; приблизительно 0,19%; приблизительно 0,20%; приблизительно 0,21%; приблизительно 0,22%; приблизительно 0,23%; приблизительно 0,24%; приблизительно 0,25%; приблизительно 0,26%; приблизительно 0,27%; приблизительно 0,28%; приблизительно 0,29% или приблизительно 0,30% поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 80). В некоторых вариантах осуществления составы содержат приблизительно 0,1% поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 80). Каждое из процентных значений, указанных выше, соответствует проценту по массе/объему (мас./об.). В некоторых случаях составы содержат от  $0,01\% \pm 0,005\%$  до  $0,5\% \pm 0,25\%$  (мас./об.) полисорбата 80. В некоторых случаях составы содержат  $0,1\% \pm 0,05\%$  (мас./об.) полисорбата 80. В некоторых случаях составы содержат  $0,1\% \pm 0,01\%$  (мас./об.) полисорбата 80.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению также могут содержать буфер или буферную систему, служащие для поддержания стабильного pH и способствующие стабилизации биспецифичного антитела против CD20×CD3. В некоторых вариантах осуществления буфер или буферная система содержит по меньшей мере один буфер, который имеет диапазон буферирования, который полностью или частично перекрывается с диапазоном pH от 5,5 до 6,1. В отдельных вариантах осуществления буфер содержит гистидиновый буфер. В отдельных вариантах осуществления буфер (например, гистидин) присутствует в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 40 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 30 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ; от приблизительно 3 мМ до приблизительно 18 мМ; от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ; или от при-

близительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер (например, гистидин) присутствует в концентрации приблизительно 1 мМ; приблизительно 2 мМ; приблизительно 3 мМ; приблизительно 4 мМ; приблизительно 5 мМ; приблизительно 6 мМ; приблизительно 7 мМ; приблизительно 8 мМ; приблизительно 9 мМ; приблизительно 10 мМ; приблизительно 11 мМ; приблизительно 12 мМ; приблизительно 13 мМ; приблизительно 14 мМ; приблизительно 15 мМ; приблизительно 16 мМ; приблизительно 17 мМ; приблизительно 18 мМ; приблизительно 19 мМ или приблизительно 20 мМ. В некоторых случаях составы содержат гистидиновый буфер в концентрации от  $5 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$  до  $15 \text{ мМ} \pm 3 \text{ мМ}$ . В некоторых случаях составы содержат гистидиновый буфер в концентрации  $10 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ . В некоторых вариантах осуществления гистидиновый буфер содержит L-гистидин и моногидрат моногидрохлорида L-гистидина. В некоторых случаях гистидиновый буфер содержит L-гистидин в концентрации  $3,65 \text{ мМ} \pm 0,5 \text{ мМ}$  и моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации  $6,35 \text{ мМ} \pm 0,5 \text{ мМ}$ . В некоторых случаях гистидиновый буфер содержит L-гистидин в концентрации  $3,65 \text{ мМ} \pm 0,2 \text{ мМ}$  и моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации  $6,35 \text{ мМ} \pm 0,2 \text{ мМ}$ . В некоторых вариантах осуществления составы содержат ацетатный буфер (например, при любой из концентраций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления составы содержат фосфатный буфер (например, при любой из концентраций, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе).

В процессе очистки антитела может быть желательно или необходимо заменить один буфер на другой для достижения требуемых концентраций вспомогательных веществ, концентрации антитела, pH и т.д. Замена буфера может быть осуществлена, например, с помощью ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием, например, полупроницаемой мембраны для тангенциальной фильтрации. Однако использование таких методов может вызвать эффект Гиббса-Доннана (Bolton et al., 2011, Biotechnol. Prog. 27(1):140-152). Накопление положительного заряда с той стороны мембраны, где находится продукт, во время концентрирования белка электрически уравнивается преимущественным движением положительных ионов к противоположной стороне мембраны. Потенциальным последствием этого явления является то, что конечные концентрации некоторых компонентов (например, гистидина) могут быть ниже предполагаемых целевых концентраций этих компонентов из-за электростатического отталкивания положительно заряженных вспомогательных веществ диафильтрационного буфера и положительно заряженного белка антитела во время стадии УФ/ДФ. Таким образом, настоящее изобретение включает составы, в которых концентрация, например, гистидина отклоняется от указанных в настоящем документе количеств или диапазонов из-за эффекта Гиббса-Доннана.

Исключение объема описывает состояние высококонцентрированных образцов, при котором значительная часть всего объема раствора занята растворенным веществом, в особенности крупными молекулами, такими как белки, с исключением растворителя из этого пространства. Это приводит к уменьшению общего объема растворителя, доступного для растворения других веществ, что может привести к неравному распределению веществ по обе стороны ультрафильтрационной мембраны. Таким образом, настоящее изобретение включает составы, в которых концентрация, например, гистидина может отклоняться от количеств или диапазонов, указанных в настоящем документе, вследствие эффекта исключения объема.

В процессе производства составов согласно настоящему изобретению могут иметь место вариации компонентов состава. Эти вариации могут затрагивать концентрацию активного ингредиента, концентрацию вспомогательных веществ и/или pH состава. Настоящее изобретение включает составы, содержащие биспецифичные антитела против CD20хCD3, которые являются стабильными и сохраняют активность при отклонении концентрации вспомогательного вещества на величину по меньшей мере до 10%. Например, настоящее изобретение включает составы биспецифичного антитела против CD20хCD3, где на стабильность и активность составов не влияет отклонение концентрации антитела, сахарозы, гистидинового буфера и/или полисорбата на  $\pm 10\%$  или  $\pm 20\%$ .

#### **Стабильность фармацевтических составов**

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению демонстрируют высокие уровни стабильности. Термин "стабильный", используемый в контексте настоящего документа применительно к фармацевтическим составам, означает, что антитела в фармацевтических составах сохраняют на приемлемом уровне структуру, и/или функцию, и/или биологическую активность после хранения в течение определенного периода времени. Состав может быть стабильным, даже если антитело, содержащееся в нем, не сохраняет на 100% свою структуру, и/или функцию, и/или биологическую активность после хранения в течение определенного периода времени. При определенных обстоятельствах сохранение приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% структуры, и/или функции, и/или биологической активности антитела после хранения в течение определенного периода времени можно рассматривать как признак "стабильности".

Стабильность может быть измерена, среди прочего, путем определения процентной доли нативного антитела, оставшейся в составе после хранения в течение определенного периода времени при данной

температуре. Процентная доля нативного антитела может быть определена, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [SE-ВЭЖХ]). Выражение "приемлемый уровень стабильности" в контексте настоящего документа означает, что по меньшей мере 90% антител в нативной форме может быть обнаружено в составе после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре. В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% антител в нативной форме может быть обнаружено в составе после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре. Определенный период времени, по прошествии которого измеряют стабильность, может составлять по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца, по меньшей мере 30 месяцев, по меньшей мере 36 месяцев или более. Температура, при которой можно хранить фармацевтический состав при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от приблизительно  $-80^{\circ}\text{C}$  до приблизительно  $45^{\circ}\text{C}$ , например температуру хранения, составляющую приблизительно  $-80^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $-30^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $-20^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $0^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $4-8^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $5^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $35^{\circ}\text{C}$ , приблизительно  $37^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $45^{\circ}\text{C}$ . Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после 3 месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96% или 97% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 6 месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96% или 97% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 9 месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 12 месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 24 месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 36 месяцев хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 3 месяцев хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 6 месяцев хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 9 месяцев хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 95%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или 99,5% нативного антитела. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 1 месяца хранения при  $45^{\circ}\text{C}$  методом SE-ВЭЖХ обнаружено более чем приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% нативного антитела.

Для оценки стабильности составов согласно настоящему изобретению могут быть использованы и другие методы, такие как, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для определения термической стабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности, а также поглощение при приблизительно 350 нм или приблизительно 405 нм для определения мутности раствора. Например, состав согласно настоящему изобретению можно считать стабильным, если после 6 или более месяцев хранения при температуре от приблизительно 5 до приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$  изменение ОП<sub>405</sub> состава составляет менее чем приблизительно 0,05 (например, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) относительно ОП<sub>405</sub> состава в момент времени  $t=0$ .

Измерение аффинности связывания антитела с его мишенью также может быть использовано для оценки стабильности. Например, состав согласно настоящему изобретению может рассматриваться как стабильный, если после хранения, например, при  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$  и т.д. в течение определенного периода времени (например, от 14 дней до 9 месяцев) биспецифичное антитело против CD20×CD3, содержащееся в составе, связывается с CD20 человека и CD3 человека с аффинностью, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или более от аффинности связывания антитела до указанного хранения. Аффинность связывания может быть определена любым методом, таким как, например, ELISA или плазмонный резонанс. Биологическая активность может быть определена с помощью анализа активности CD20 или CD3, например, путем приведения клетки, экспрессирующей CD20 или CD3, в контакт с составом, содержащим биспецифичное антитело против CD20×CD3. Связывание антитела с такой клеткой может быть измерено напрямую, например, методом FACS-анализа.

Стабильность может быть измерена, среди прочего, путем определения процентной доли антитела, которая образует агрегаты (высокомолекулярные (ВМ) соединения) в составе после хранения в течение

определенного периода времени при определенной температуре, где стабильность обратно пропорциональна процентной доле образовавшихся агрегатов. Процентная доля агрегированного антитела может быть определена, среди прочего, методом эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [SE-ВЭЖХ] или эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии [SE-СВЭЖХ]). Выражение "приемлемый уровень стабильности" в контексте настоящего документа означает, что не более 6% антитела находится в агрегированной форме, обнаруженной в составе после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре. В отдельных вариантах осуществления приемлемый уровень стабильности означает, что не более чем приблизительно 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела может быть обнаружено в агрегированной форме в составе после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре. Определенный период времени, по прошествии которого измеряют стабильность, может составлять по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца, по меньшей мере 30 месяцев, по меньшей мере 36 месяцев или более. Температура, при которой можно хранить фармацевтический состав при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от приблизительно -80 до приблизительно 45°C, например, температуру хранения, составляющую приблизительно -80°C, приблизительно -30°C, приблизительно -20°C, приблизительно 0°C, приблизительно 4-8°C, приблизительно 5°C, приблизительно 25°C, приблизительно 35°C, приблизительно 37°C или приблизительно 45°C. Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после девяти месяцев хранения при 5°C менее чем приблизительно 2%, 1,75%, 1,5%, 1,25%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% или 0,1% антитела обнаружено в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после трех месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60% менее чем приблизительно 2%, 1,75%, 1,5%, 1,25%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% или 0,1% антитела обнаружено в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 1 месяца хранения при 45°C менее чем приблизительно 6%, 5,9%, 5,8%, 5,7%, 5,6%, 5,5%, 5%, 4,5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела обнаружено в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после трех месяцев хранения при -20°C, -30°C или -80°C менее чем приблизительно 2%, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела обнаружено в агрегированной форме.

Стабильность может быть измерена, среди прочего, путем определения процентной доли антитела, которая мигрирует в более кислой фракции при ионном обмене ("кислая форма"), чем главная фракция антитела ("форма главного заряда"), где стабильность обратно пропорциональна фракции антитела в кислой форме. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что дезамидирование антитела может приводить к тому, что антитело становится более отрицательно заряженным, и, следовательно, более кислым по сравнению с не дезамидированным антителом (см., например, Robinson, N., Protein Deamidation, PNAS, April 16, 2002, 99(8):5283-5288). Процентная доля "закисленного" антитела может быть определена методом ионообменной хроматографии (например, катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии [СЕХ-ВЭЖХ] или катионообменной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии [СЕХ-СВЭЖХ]). Выражение "приемлемый уровень стабильности" в контексте настоящего документа означает, что не более 52% антитела находится в более кислой форме, обнаруженной в составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре. В отдельных вариантах осуществления приемлемый уровень стабильности означает, что не более чем приблизительно 52%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела может быть обнаружено в кислой форме в составе после хранения в течение определенного периода времени при данной температуре. Определенный период времени, по прошествии которого измеряют стабильность, может составлять по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца, по меньшей мере 30 месяцев, по меньшей мере 36 месяцев или более. Температура, при которой можно хранить фармацевтический состав при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от приблизительно -80°C до приблизительно 45°C, например, температуру хранения, составляющую приблизительно -80°C, приблизительно -30°C, приблизительно -20°C, приблизительно 0°C, приблизительно 4-8°C, приблизительно 5°C, приблизительно 25°C или приблизительно 45°C. Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после трех месяцев хранения при -80°C, -30°C или -20°C менее чем приблизительно 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после девяти месяцев хранения при 5°C менее чем приблизительно 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%,

19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 28 дней хранения при 25°C менее чем приблизительно 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 28 дней хранения при 37°C менее чем приблизительно 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 28 дней хранения при 45°C менее чем приблизительно 52%, 51%, 50%, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% антитела может быть обнаружено в более кислой форме.

Указание стабильности фармацевтических составов "после" конкретного периода времени подразумевает, что измерение параметра стабильности (например, % нативной формы, % ВМ соединений или % кислой формы) проводят по завершении или приблизительно по завершении конкретного периода времени, и не подразумевает, что фармацевтический состав обязательно сохранит такой же уровень стабильности для измеряемого параметра после этого. Например, упоминание конкретного определенной стабильности через 9 месяцев означает, что измерение стабильности проводили через или приблизительно через 9 месяцев после начала исследования. Дополнительные методы оценки стабильности антитела в составе продемонстрированы в примерах, приведенных далее.

Как проиллюстрировано в приведенных далее примерах, настоящее изобретение основано, среди прочего, на открытии того, что комбинация заявленных вспомогательных веществ и биспецифичного антитела против CD20хCD3 обеспечивает состав, который является стабильным.

#### Примеры составов

Согласно одному аспекту настоящего изобретения фармацевтический состав содержит: (i) биспецифичное антитело человека против CD20хCD3, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека; (ii) буфер, содержащий гистидин; (iii) органический соразтворитель, содержащий полисорбат; и (iv) стабилизатор, содержащий сахар.

В некоторых случаях стабильный жидкий фармацевтический состав содержит (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека и содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, в концентрации от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл; (ii) гистидин в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ; (iii) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,05% (мас./об.) до приблизительно 0,15% (мас./об.); и (iv) сахарозу в концентрации от приблизительно 5% (мас./об.) до приблизительно 15% (мас./об.), где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых случаях стабильный жидкий фармацевтический состав содержит (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека и содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, в концентрации от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, где антитело имеет константные области тяжелой цепи изотипа IgG1 (необязательно, где одна из двух тяжелых цепей имеет модификацию, снижающую связывание белка А по сравнению с немодифицированной тяжелой цепью того же изотипа, и, необязательно, где одна или обе из двух тяжелых цепей имеют химерный шарнир); (ii) гистидин в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ; (iii) полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,05% (мас./об.) до приблизительно 0,15% (мас./об.); и (iv) сахарозу в концентрации от приблизительно 5% (мас./об.) до приблизительно 15% (мас./об.), где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ .

В некоторых случаях стабильный жидкий фармацевтический состав содержит (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека и содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, в концентрации от













концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл, в воде, где состав имеет pH 5,8  $\pm$  0,3.

В некоторых случаях стабильный жидкий фармацевтический состав содержит: (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека и содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл; (ii) L-гистидин в концентрации 0,57 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iii) моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации 1,33 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iv) полисорбат 80 в концентрации 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл и (v) сахарозу в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл, в воде, где состав имеет pH 5,8  $\pm$  0,3.

В некоторых случаях стабильный жидкий фармацевтический состав содержит: (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека и содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл, где антитело имеет константные области тяжелой цепи изотипа IgG1 (необязательно, где одна из двух тяжелых цепей имеет модификацию, снижающую связывание белка А по сравнению с немодифицированной тяжелой цепью того же изотипа, и, необязательно, где одна или обе из двух тяжелых цепей имеют химерный шарнир); (ii) L-гистидин в концентрации 0,57 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iii) моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации 1,33 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iv) полисорбат 80 в концентрации 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл и (v) сахарозу в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл, в воде, где состав имеет pH 5,8  $\pm$  0,3.

В некоторых случаях стабильный жидкий фармацевтический состав содержит: (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека и содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD20 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл, где антитело имеет константные области тяжелой цепи изотипа IgG4 (необязательно, где одна из двух тяжелых цепей имеет модификацию, снижающую связывание белка А по сравнению с немодифицированной тяжелой цепью того же изотипа, и, необязательно, где одна или обе из двух тяжелых цепей имеют химерный шарнир); (ii) L-гистидин в концентрации 0,57 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iii) моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации 1,33 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iv) полисорбат 80 в концентрации 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл и (v) сахарозу в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл, в воде, где состав имеет pH 5,8  $\pm$  0,3.

В некоторых случаях стабильный жидкий фармацевтический состав содержит: (i) биспецифичное антитело человека, которое специфично связывается с CD20 человека и CD3 человека и содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и общую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл; (ii) L-гистидин в концентрации 0,57 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iii) моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации 1,33 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл; (iv) полисорбат 80 в концентрации 1 мг/мл  $\pm$  0,1 мг/мл и (v) сахарозу в концентрации 100 мг/мл  $\pm$  10 мг/мл, в воде, где состав имеет pH 5,8  $\pm$  0,3.

В любом из этих иллюстративных составов "стабильный" может быть определен как: (a) по меньшей мере 90% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C, по данным эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-СВЭЖХ); (b) по меньшей мере 93% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C, по данным SE-СВЭЖХ; (c) по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C, по данным SE-СВЭЖХ; (d) по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ; (e) по меньшей мере 97% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ; (f) по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ; (g) по меньшей мере 98% антитела имеет нативную конформацию после 3 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ; (h) состав содержит не более 6% высокомолекулярных (ВМ) соединений после 1 месяца хранения при 45°C, по данным SE-СВЭЖХ; (i) состав содержит не более 5,6% ВМ соединений после 1 месяца хранения при 45°C, по

данным SE-СВЭЖХ; (j) состав содержит не более 2% ВМ соединений после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ; (k) состав содержит не более 1% ВМ соединений после 3 месяцев хранения при 25°C и относительной влажности 60%, по данным SE-СВЭЖХ; (l) состав содержит не более 1,5% ВМ соединений после 3 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ и/или (m) состав содержит не более 1% ВМ соединений после 9 месяцев хранения при 5°C, по данным SE-СВЭЖХ.

В любом из этих иллюстративных составов биспецифичное антитело может включать модификацию одной или обеих тяжелых цепей для облегчения очистки биспецифичного антитела (т.е. гетеродимера) от гомодимерных примесей. В некоторых вариантах осуществления биспецифичные антитела включают первую и вторую тяжелые цепи (т.е. тяжелую цепь CD20-связывающего плеча и тяжелую цепь CD3-связывающего плеча), которые являются идентичными (например, обе относятся к изолипу IgG1 или IgG4), за исключением модификации в домене СН3 одной или другой тяжелой цепи, снижающей связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с антителом без указанной модификации. В некоторых случаях домен СН3 первой тяжелой цепи (например, CD20-связывающего плеча) связывает белок А, а домен СН3 второй тяжелой цепи (например, CD3-связывающего плеча) содержит мутацию, снижающую или устраняющую связывание белка А. В некоторых случаях мутация представляет собой модификацию Н435R (по нумерации EU; Н95R по нумерации экзонов IMGT). В некоторых случаях мутация представляет собой модификацию Н435R (по нумерации EU; Н95R по нумерации экзонов IMGT) и модификацию Y436F (по нумерации EU; Y96F по IMGT). Другие модификации, которые могут содержаться во втором домене СН3, включают: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I по IMGT) в случае доменов СН3 IgG1; и Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I по IMGT) в случае доменов СН3 IgG4.

Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтических составов, охватываемых настоящим изобретением, приведены в других разделах настоящего документа, включая демонстрационные примеры, представленные далее.

#### **Контейнеры и способы введения**

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению могут содержаться в любом контейнере, подходящем для хранения лекарственных препаратов и других терапевтических композиций. Например, фармацевтические составы могут содержаться в герметичном и стерилизованном пластиковом или стеклянном контейнере, имеющем определенный объем, таком как флакон, ампула, шприц, картридж, бутылка или пакет для внутривенного (в/в) введения. Для хранения составов согласно настоящему изобретению можно применять различные типы флаконов, включая, например, прозрачные и непрозрачные (например, из темного стекла) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогичным образом, для хранения и/или введения фармацевтических составов согласно настоящему изобретению можно применять любой тип шприцев. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержится в предварительно заполненном шприце. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержится в предварительно заполненном шприце с несъемной иглой.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению могут содержаться в шприцах "с обычным содержанием вольфрама" или в шприцах "с низким содержанием вольфрама". Как известно специалистам в данной области техники, процесс изготовления стеклянных шприцев, как правило, включает использование нагретого вольфрамового стержня, функция которого заключается в прокалывании стекла и создании тем самым отверстия, через которое можно отбирать и извлекать жидкость из шприца. Этот процесс приводит к осаждению следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца. Для снижения количества вольфрама в шприце может быть использована последующая промывка и другие стадии обработки. В контексте настоящего документа термин "с обычным содержанием вольфрама" означает, что шприц содержит более 500 частей на миллиард (ppb) вольфрама. Термин "с низким содержанием вольфрама" означает, что шприц содержит менее 500 ppb вольфрама. Например, шприц с низким содержанием вольфрама согласно настоящему изобретению может содержать менее чем приблизительно 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 ppb вольфрама или менее.

Резиновые поршни, используемые в шприцах, и резиновые пробки, используемые для закрытия горлышек флаконов, могут иметь покрытие для предотвращения загрязнения содержащегося в шприце или флаконе лекарственного препарата и/или сохранения его стабильности. Таким образом, фармацевтические составы согласно настоящему изобретению согласно отдельным вариантам осуществления могут содержаться в шприце, содержащем поршень с покрытием, или во флаконе, закрытом резиновой пробкой с покрытием. Например, поршень или пробка могут иметь покрытие, представляющее собой фторуглеродную пленку. Примеры пробок и/или поршней с покрытием, подходящих для применения во флаконах и шприцах, содержащих фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, упомянуты, например, в патентах США №№ 4997423, 5908686, 6286699, 6645635 и 7226554, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Конкретные примеры резиновых пробок и поршней с покрытием, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, ком-

мерчески доступны под товарным знаком "FluroTec®" от West Pharmaceutical Services, Inc. (Лайонвилл, Пенсильвания). FluroTec® представляет собой пример фторуглеродного покрытия, используемого для минимизации или предотвращения прилипания лекарственного препарата к резиновым поверхностям. Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения фармацевтические составы могут содержаться в шприце с низким содержанием вольфрама, который содержит поршень с фторуглеродным покрытием.

Фармацевтические составы могут быть введены пациенту парентеральными способами, такими как инъекция (например, подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутривнутрибрюшинная и т.д.), или чрескожным, чресслизистым, интраназальным, ингаляционным и/или пероральным способами. Множество многоразовых шприцев-ручек и/или автоинъекторов могут применяться для подкожной доставки фармацевтических составов согласно настоящему изобретению. Примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия), и другие. Примеры устройств для доставки в виде одноразовых шприцев-ручек и/или автоинъекторов, подходящих для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), шприц-ручку PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс), и другие. В некоторых случаях фармацевтический состав содержится в шприце, специально предназначенном для использования с автоинъектором.

В настоящем документе также предусмотрено применение микроинфузора для доставки фармацевтических составов согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего документа термин "микроинфузор" означает устройство для подкожной доставки, предназначенное для медленного введения больших объемов (например, до приблизительно 2,5 мл, приблизительно 3,0 мл или более) терапевтического состава в течение длительного периода времени (например, приблизительно 10, 15, 20, 25, 30 или более минут). См., например, патенты США №№ 6629949, US 6659982 и Meehan et al., J. Controlled Release 46:107-116 (1996). Микроинфузоры особенно эффективны для доставки больших доз терапевтических белков, содержащихся в высококонцентрированных (например, приблизительно 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл) и/или вязких растворах.

В отдельных вариантах осуществления фармацевтический состав вводят с помощью в/в капельницы, так что состав разводят в пакете для в/в вливания, содержащем физиологически приемлемый раствор. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой экстемпоральный стерильный препарат в пакете для внутривенной инфузии, так что разовую дозу лекарственного препарата разводят в 100, 250 мл (или в другом подобном количестве, подходящем для внутривенного капельного введения) физиологического буфера (например, 0,9% физиологического раствора).

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению также могут содержаться в единичной лекарственной форме. Термин "единичная лекарственная форма" в контексте настоящего документа относится к физически обособленной единице, подходящей в качестве однократной дозировки для пациента, подлежащего лечению, где каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное таким образом, чтобы обеспечивать желаемый терапевтический эффект в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. В различных вариантах осуществления единичная лекарственная форма содержится в контейнере, как описано в настоящем документе. Фактические уровни дозировки активного ингредиента (например, биспецифичного антитела против CD20×CD3) в составах согласно настоящему изобретению могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, эффективного для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, для конкретной композиции и конкретного способа введения в отсутствие нежелательного эффекта у пациента. Выбранный уровень дозировки зависит от ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций согласно настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного применяемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или вещества, применяемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и анамнез пациента, лечение которого осуществляют, и прочих факторов, хорошо известных в области медицины. Термин "разбавитель" в контексте настоящего документа относится к раствору, подходящему для изменения или достижения иллюстративной или требуемой концентрации или концентраций, как описано в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления единичная лекарственная форма содержит количество активного ингредиента (например, биспецифичного антитела против CD20×CD3), предназначенное для

разового применения. В различных вариантах осуществления количество активного ингредиента в единичной лекарственной форме составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 5000 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 1000 мг и от приблизительно 100 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 400 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 200 мг, от приблизительно 250 до приблизительно 350 мг, от приблизительно 125 до приблизительно 175 мг, от приблизительно 275 до приблизительно 325 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 250 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 25 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг или находится в диапазонах или интервалах, образованных указанными значениями. Подразумевается, что диапазоны, промежуточные по отношению к указанным выше значениям, например, от приблизительно 2 до приблизительно 100 мг или от 2 до 20 мг, также являются частью настоящего изобретения. Например, подразумевается, что включены диапазоны значений, полученные при использовании комбинации любых из указанных выше значений (или значений, содержащихся в указанных выше диапазонах) в качестве верхнего и/или нижнего пределов. В частном варианте осуществления состав часто поставляется в виде жидкости в единичной лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления единичная лекарственная форма содержит от 2 до 2,5 мг или от 10 до 11 мг, от 20 до 25 мг, от 80 до 90 мг, от 100 до 125 мг, от 160 до 180 мг, от 200 до 225 или от 320 до 360 мг. В некоторых вариантах осуществления единичная лекарственная форма согласно настоящему изобретению подходит для подкожного введения пациенту (например, единичная лекарственная форма, содержащая антитело в концентрации приблизительно 100 мг/мл или приблизительно 160 мг/мл).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена единичная лекарственная форма, содержащая приблизительно 2 мг антитела в стабильном составе, где состав содержит антитело в концентрации  $2 \text{ мг/мл} \pm 0,2 \text{ мг/мл}$ ; (ii) L-гистидин в концентрации  $0,57 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; (iii) моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации  $1,33 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; (iv) полисорбат 80 в концентрации  $1 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; и (v) сахарозу в концентрации  $100 \text{ мг/мл} \pm 10 \text{ мг/мл}$ , в воде, где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ . В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена единичная лекарственная форма, содержащая приблизительно 20 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 160 мг или приблизительно 320 мг антитела в стабильном составе, где состав содержит антитело в концентрации  $20 \text{ мг/мл} \pm 2 \text{ мг/мл}$ ; (ii) L-гистидин в концентрации  $0,57 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; (iii) моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации  $1,33 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; (iv) полисорбат 80 в концентрации  $1 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; и (v) сахарозу в концентрации  $100 \text{ мг/мл} \pm 10 \text{ мг/мл}$ , в воде, где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ . В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена единичная лекарственная форма, содержащая приблизительно 100 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг или приблизительно 400 мг антитела в стабильном составе, где состав содержит антитело в концентрации  $100 \text{ мг/мл} \pm 10 \text{ мг/мл}$ ; (ii) L-гистидин в концентрации  $0,57 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; (iii) моногидрат моногидрохлорида L-гистидина в концентрации  $1,33 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$ ; (iv) полисорбат 80 в концентрации  $1 \text{ мг/мл} \pm 0,1 \text{ мг/мл}$  и (v) сахарозу в концентрации  $100 \text{ мг/мл} \pm 10 \text{ мг/мл}$ , в воде, где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ .

Настоящее изобретение также включает способы получения единичной лекарственной формы. В иллюстративном варианте осуществления способ получения фармацевтической единичной лекарственной формы включает смешивание состава согласно любому из предшествующих вариантов осуществления в подходящем контейнере (например, в контейнерах, описанных в настоящем документе).

В различных вариантах осуществления фармацевтические составы содержатся в контейнерах (например, во флаконе или предварительно заполненном шприце), которые могут содержать газ в свободном пространстве с менее чем 5 об.% окисляющего газа (например, кислорода). Концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном пространстве контейнера может составлять менее 4,5%, менее 4%, менее 3,5%, менее 3%, менее 2,5%, менее 2% или менее 1,5% в различных вариантах осуществления. В одном варианте осуществления концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном пространстве составляет менее приблизительно 1%. В одном варианте концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном пространстве составляет не более приблизительно 0,5%. В одном варианте концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном пространстве составляет не более приблизительно 0,1%. В различных вариантах осуществления концентрация окисляющего газа (например, кислорода) в свободном пространстве контейнера с лекарственным препаратом составляет менее 0,9%, менее 0,8%, менее 0,7%, менее 0,6%, менее 0,5%, менее 0,4%, менее 0,3%, менее 0,2% или менее 0,1%. В некоторых случаях концентрация кислорода в газе в свободном пространстве составляет от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,5%. В некоторых случаях концентрация кислорода в газе в свободном пространстве составляет от приблизительно 0,75% до приблизительно 1,25%. В некоторых случаях концентрация кислорода в газе в свободном пространстве составляет от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,15%. В различных вариантах осуществления окисляющий газ (например, кислород) в свободном пространстве заменяют или по существу заменяют инертным газом, таким как азот, аргон, гелий, ксенон, неон, криптон или радон. В одном варианте осуществления неокисляющий газ представляет собой азот. В одном варианте осуществления неокисляющий газ пред-

ставляет собой аргон.

### Применения фармацевтических составов в терапевтических целях

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению подходят, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или расстройства, связанного с клеткой, экспрессирующей CD20 человека. Иллюстративные неограничивающие заболевания и расстройства, подлежащие лечению путем введения фармацевтических составов согласно настоящему изобретению, включают В-клеточные раковые заболевания, такие как неходжкинские лимфомы, например, фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, мантийноклеточную лимфому и лимфому маргинальной зоны.

Способы лечения согласно настоящему изобретению включают введение субъекту любого состава, содержащего биспецифичное антитело против CD20xCD3, как описано в настоящем документе. Субъект, которому вводят фармацевтический состав, может представлять собой, например, любого человека или животное, не являющееся человеком, который(-ое) нуждается в таком лечении. Например, субъект может представлять собой индивидуума, у которого диагностировано любое из указанных выше заболеваний или расстройств или имеется риск их развития. Настоящее изобретение также включает применение любых фармацевтических составов, описанных в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для лечения любого заболевания или расстройства, связанного с клеткой, экспрессирующей CD20 человека, включая любые упомянутые выше примеры заболеваний, расстройств и состояний.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены наборы, включающие фармацевтический состав (например, контейнер с составом или единичную лекарственную форму), как описано в настоящем документе, и упаковку или этикетку (например, листок-вкладыш в упаковку) с инструкциями по применению фармацевтического состава для лечения заболевания или расстройства, как описано выше. В некоторых случаях инструкции предусматривают применение единичной лекарственной формы, как описано в настоящем документе, для лечения заболевания или расстройства.

Краткий обзор последовательностей и соответствующих SEQ ID NO, упомянутых в настоящем документе, приведен в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Сводная информация о последовательностях

SEQ ID NO:	Описание
1	CD20-специфичная тяжелая цепь
2	CD3-специфичная тяжелая цепь
3	Общая CD20- и CD3-специфичная легкая цепь
4	CD20-специфичная HCVR
5	CD3-специфичная HCVR
6	Общая CD20- и CD3-специфичная LCVR
7	CD20-специфичная HCDR1
8	CD20-специфичная HCDR2
9	CD20-специфичная HCDR3
10	CD3-специфичная HCDR1
11	CD3-специфичная HCDR2
12	CD3-специфичная HCDR3
13	Общая CD20- и CD3-специфичная LCDR1
14	Общая CD20- и CD3-специфичная LCDR2
15	Общая CD20- и CD3-специфичная LCDR3
16	Константная область тяжелой цепи IgG4
17	Константная область тяжелой цепи IgG4 с H435R/Y436F
18	Константная область тяжелой цепи IgG1
19	Константная область тяжелой цепи IgG1 с H435R/Y436F

### Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как реализовывать и применять способы и композиции согласно изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения считают созданным ими изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количество, температуры и т.д.), но следует учитывать возможность некоторых погрешностей эксперимента и отклонений. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура указана в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1. Разработка стабильных жидких составов биспецифичного антитела против CD20×CD3

Деятельность по разработке составов включала оценку буферов, pH, органических соразтворителей, поверхностно-активных веществ и термических стабилизаторов для определения вспомогательных веществ, повышающих стабильность белка. Результаты, полученные в этих исследованиях, а также обсуждаемые в примере 2, были использованы для разработки стабильного жидкого состава, подходящего для клинического применения.

Изучали влияние буфера и pH на термическую стабильность REGN1979 в жидких составах путем инкубации 15 мг/мл REGN1979 при 45°C в течение 28 дней в разных буферных системах при разных диапазонах pH. Были исследованы следующие pH и буферные системы: ацетат (pH от 4,5 до 5,5), L-гистидин (pH от 5,5 до 6,5) и фосфат (pH от 6,0 до 7,0). Согласно результатам анализа SE-СВЭЖХ максимальная стабильность белка наблюдалась при включении REGN1979 в состав при pH от 5,5 до 6,0 в гистидиновом буфере (табл. 2). Согласно результатам анализа СЕХ-СВЭЖХ максимальная стабильность белка наблюдалась при включении REGN1979 в состав при pH от 5,5 до 6,0 в гистидиновом буфере, или при pH от 4,5 до 5,0 в ацетатном буфере. В этих анализах также было определено, что фрагментация (т.е. образование низкомолекулярных соединений), образование ВМ соединений и вариантов с измененным зарядом являлись основными путями разложения. Гистидиновый буфер был выбран в качестве рецептурного буфера для составов лекарственных препаратов (ЛП), поскольку он сводил к минимуму образование высокомолекулярных соединений - путь разложения, который вызывал наибольшую озабоченность. Для составов ЛП было выбрано значение pH 5,8, поскольку при этом значении pH было сведено к минимуму образование высокомолекулярных соединений и вариантов с измененным зарядом. На основании этих результатов, а также результатов, обсуждаемых в примере 2, для составов ЛП REGN1979 был выбран 10 мМ гистидиновый буфер с pH 5,8.

Термические стабилизаторы, такие как сахароза, часто добавляют в составы на основе антител для повышения термической стабильности белка. REGN1979 в концентрации 25 мг/мл в жидком составе демонстрировал повышенную стабильность при добавлении 10% сахарозы и инкубации в условиях ускоренного разложения (табл. 3). После инкубации при 45°C в течение 28 дней уровень ВМ соединений увеличился на 0,6% в составе, содержащем 10% сахарозы, а в составе без сахарозы увеличение составило 1,4%. На основании этих результатов, а также результатов, обсуждаемых в примере 2, сахароза была выбрана в качестве термического стабилизатора для состава ЛП REGN1979.

Органические соразтворители, такие как поверхностно-активные вещества, часто добавляют в составы на основе антител для защиты белка от агрегации, вызванной перемешиванием. Исследовали влияние поверхностно-активных веществ на стабильность в стрессовых условиях перемешивания и термическую стабильность 25 мг/мл REGN1979. В этом примере были оценены следующие поверхностно-активные вещества: 0,1% полисорбата 20 и 0,1% полисорбата 80. Результаты исследований стабильности в стрессовых условиях перемешивания и термической стабильности приведены в табл. 4 и табл. 5, соответственно. REGN1979 было нестабильно при перемешивании на вортексе в течение 120 мин в отсутствие поверхностно-активного вещества. В отсутствие поверхностно-активного вещества состав продемонстрировал 1,5-процентное увеличение уровня ВМ соединений по данным SE-ВЭЖХ (табл. 4). Оба испытанных поверхностно-активных вещества защищали REGN1979 от нестабильности, вызванной перемешиванием, в одинаковой степени (табл. 4). Более того, оба испытанных поверхностно-активных вещества снижали термическую стабильность REGN1979 в одинаковой степени, что проявлялось в увеличении уровня ВМ соединений, НМ соединений и щелочных заряженных вариантов (табл. 5). На основании этих результатов, а также результатов, обсуждаемых в примере 2, полисорбат 80 был выбран в качестве поверхностно-активного вещества для составов ЛП REGN1979.

REGN1979 продемонстрировало максимальную стабильность при включении в состав в присутствии гистидина, полисорбата 80 и сахарозы при pH 5,8. Основными путями разложения, выявленными при разработке жидких составов REGN1979, были образование высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений и вариантов с измененным зарядом. На основании результатов этих экспериментов и результатов, обсуждаемых в примере 2, было установлено, что наиболее стабильным являлся водный забуференный состав, содержащий 10 мМ гистидина, pH 5,8, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, 10% (мас./об.) сахарозы и 2-160 мг/мл (например, 2 мг/мл, 20 мг/мл или 100 мг/мл) REGN1979.

Таблица 2. Влияние буфера и pH на стабильность 15 мг/мл REGN1979 после инкубации при 45°C в течение 28 дней

Состав		15 мг/мл REGN1979, 10 мМ буфера								
Объем фасовки		0,4 мл								
Контейнер/средство укупорки		Флакон I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробкой из эластомера 4432/50 с покрытием FluroTec®								
pH/буфер	Номер партии FDG	Исследование цвета и внешнего вида	Мутность (Увеличение ОП при 405 нм)	% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ	Изменение чистоты по данным SE-СВЭЖХ <sup>1)</sup>			Изменение уровня вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ <sup>a</sup>		
					ВМ, %	Нативная форма, %	НМ, %	Кислая форма, %	Главная форма, %	Щелочная форма, %
pH 4,5, ацетат	L13-529	Пройдено	0,01	98	5,2	-6,0	0,8	-0,8	-7,4	8,2
pH 5,0, ацетат	L13-528	Пройдено	0,00	99	1,5	-1,9	0,4	6,3	-6,0	-0,3
pH 5,5, ацетат	L13-527	Пройдено	0,00	97	1,5	-1,8	0,3	11,8	-14,1	2,3
pH 5,5, гистидин	L13-546	Пройдено	0,00	100	1,5	-1,8	0,4	7,9	-7,1	-0,8
pH 6,0, гистидин	L13-545	Пройдено	0,00	98	1,2	-1,6	0,3	13,5	-9,1	-4,5
pH 6,5, гистидин	L13-544	Пройдено	0,01	101	2,0	-2,6	0,6	21,7	-16,6	-5,1
pH 6,0, фосфат	L13-523	Пройдено	0,01	100	1,5	-1,8	0,3	17,1	-11,6	-5,5
pH 6,5, фосфат	L13-522	Пройдено	0,01	97	2,4	-2,8	0,4	26,0	-21,0	-5,1
pH 7,0, фосфат	L13-521	Пройдено	0,21	96	2,8	-3,2	0,4	41,1	-33,2	-7,9

<sup>a</sup> Указано как изменение чистоты относительно исходного вещества. Исходное вещество (без инкубации) содержало  $\geq 93,3\%$  пика нативного антитела по данным SE-СВЭЖХ и  $\geq 64,6\%$  главного пика по данным СЕХ-СВЭЖХ для всех 9 составов

Таблица 3. Влияние сахарозы на стабильность 25 мг/мл REGN1979 после инкубации при 45°C в течение 28 дней

Состав		25 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, pH 5,5									
Объем фасовки		0,4 мл									
Контейнер/средство укупорки		Флакон I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробкой из эластомера 4432/50 с покрытием FluorTec®									
Стабилизатор	Номер партии FDG	Исследования и внешнего вида	Мутность (увеличение ОП при 405 нм)	pH	% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ	Изменение чистоты по данным SE-СВЭЖХ <sup>a</sup>			Изменение уровня вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ <sup>a</sup>		
						ВМ, %	Нативная форма, %	НМ, %	Кислая форма, %	Главная форма, %	Щелочная форма, %
Без сахарозы	L13-676	Пройдено	0,00	5,4	92	1,4	-1,9	0,6	9,0	-11,1	2,0
10% (мас./об.) сахарозы	L13-677	Пройдено	0,01	5,6	95	0,6	-0,9	0,0	8,7	-11,7	3,1

<sup>a</sup> Указано как изменение чистоты относительно исходного вещества. Исходное вещество (без инкубации) содержало  $\geq 97,1\%$  пика нативного антитела по данным SE-СВЭЖХ и  $\geq 65,4\%$  главного пика по данным СЕХ-СВЭЖХ для обоих составов

Таблица 4. Влияние поверхностно-активных веществ на стабильность 25 мг/мл REGN1979 после перемешивания (120 мин на вортексе)

Состав		25 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, pH 5,5, и 10% (мас./об.) сахарозы									
Объем фасовки		0,4 мл									
Контейнер/средство укупорки		Флакон I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробкой из эластомера 4432/50 с покрытием FluorTec®									
Поверхностно-активное вещество	Номер партии FDG	Исследование цвета и внешнего вида	Мутность (увеличение ОП при 405 нм)	pH	% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ	Изменение чистоты по данным SE-СВЭЖХ <sup>1)</sup>			Изменение уровня вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ <sup>a</sup>		
						ВМ, %	Нативная форма, %	НМ, %	Кислая форма, %	Главная форма, %	Щелочная форма, %
Без поверхностно-активного вещества	L13-677	Пройдено	0,00	5,5	99	1,5	-1,4	-0,1	-0,6	-0,2	0,8
0,1% (мас./об.) полисорбата 20	L13-678	Пройдено	0,00	5,5	100	-0,2	0,3	-0,1	0,2	-0,1	-0,1
0,1% (мас./об.) полисорбата 80	L13-679	Пройдено	0,00	5,5	103	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2

<sup>a</sup> Указано как изменение чистоты относительно исходного вещества. Исходное вещество (без инкубации) содержало  $\geq 97,1\%$  пика нативного антитела по данным SE-СВЭЖХ и  $\geq 65,4\%$  главного пика по данным СЕХ-СВЭЖХ для всех 3 составов

Таблица 5. Влияние поверхностно-активных веществ на стабильность 25 мг/мл REGN1979 после инкубации при 45°C в течение 28 дней

Состав		25 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, pH 5,5, и 10% (мас./об.) сахарозы									
Объем фасовки		0,4 мл									
Контейнер/средство укупорки		Флакон I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробкой из эластомера 4432/50 с покрытием FluorTec®									
Сорастворитель/поверхностно-активное вещество	Номер партии FDG	Исследование цвета и внешнего вида	Мутность (увеличение ОП при 405 нм)	pH	% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ	Изменение относительно уровня соединений с различной молекулярной массой по данным SE-СВЭЖХ <sup>1)</sup>			Изменение относительного уровня форм с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ <sup>a</sup>		
						ВМ, %	Нативная форма, %	НМ, %	Кислая форма, %	Главная форма, %	Щелочная форма, %
Без поверхностно-активного вещества	L13 - 677	Пройдено	0,01	5,6	95	0,6	-0,9	0,0	8,7	-11,7	3,1
0,1% (мас./об.) полисорбата 20	L13 - 678	Пройдено	0,01	5,6	95	1,9	-2,5	0,6	7,7	-16,1	8,4
0,1% (мас./об.) полисорбата 80	L13 - 679	Пройдено	0,01	5,6	97	2,0	-2,7	0,7	8,8	-17,2	8,2

<sup>a</sup> Указано как изменение чистоты относительно исходного вещества.

Исходное вещество (без инкубации) содержало  $\geq 97,1\%$  пика нативного антитела по данным SE-СВЭЖХ и  $\geq 65,4\%$  главного пика по данным СЕХ-СВЭЖХ для всех 3 составов

#### Пример 2. Хранение составов и их стабильность в стрессовых условиях

Были проведены поисковые исследования стабильности для оценки стабильности при хранении, в условиях ускоренного разложения и в стрессовых условиях составов лекарственного препарата (ЛП) REGN1979. ЛП, использованный в поисковых исследованиях стабильности, изготавливали путем фасовки 1,2 мл или 5,5 мл лекарственной субстанции, соответственно, в стеклянные флаконы I типа объемом 2 мл или 10 мл, после чего подавали слой азота. ЛП инкубировали при нескольких высокотемпературных условиях. Эти условия ускоренного разложения были выбраны для имитации условий, которым ЛП может быть подвергнут во время производства и обращения с ним, а также для выяснения путей деградации ЛП REGN1979 под слоем азота.

Стабильность при хранении: В настоящее время доступны данные исследований стабильности за 9 месяцев для ЛП во флаконах объемом 2 и 10 мл. В обеих фасовках ЛП, ЛП REGN1979 был физически и химически стабилен при хранении при 5°C в течение 9 месяцев (табл. 6 и 7). Значимые изменения каких-либо из отслеживаемых параметров физической или химической стабильности обнаружены не были.

Стабильность в условиях ускоренного разложения: Результаты анализа ЛП REGN1979 в 2 мл флаконе и 10 мл флаконе после инкубации в условиях ускоренного разложения представлены в табл. 8 и табл. 9 соответственно. Для обеих фасовок ЛП не наблюдали заметного разложения при инкубации белка в течение одного месяца при 25°C, что указывает на то, что оба ЛП REGN1979 могут подвергаться коротким периодам воздействия комнатной температуры. После инкубации в течение 28 дней при 45°C было обнаружено заметное образование ВМ, НМ соединений и вариантов с измененным зарядом. Результаты, полученные для этих условий ускоренного разложения, показали, что образование ВМ, НМ соединений и вариантов с измененным зарядом было основным путем разложения для 2 мл флакона и 10 мл флакона ЛП.

Стабильность в стрессовых условиях: Результаты исследования стабильности в стрессовых условиях для ЛП REGN1979 в 2 мл флаконе и 10 мл флаконе представлены в табл. 10 и табл. 11 соответственно. Обе фасовки ЛП были физически и химически стабильны при перемешивании (перемешивание на вортексе при температуре окружающей среды) в течение 120 мин или при подвергании 8 циклам замораживания/размораживания (замораживание при -30°C и размораживание при комнатной температуре). Значимые изменения каких-либо из отслеживаемых параметров физической или химической стабильности обнаружены не были.

Таблица 6. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 при хранении при 5°C

Состав		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8 (под слоем азота)								
Объем фасовки		1,2 мл								
Контейнер/средство укупорки		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West V2-F451W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 13 мм с покрытием FlugoTec®								
		Продолжительность хранения при 5 °C (месяцы)								
Анализ		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
pH		5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,8	5,8	5,9	
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	272	НТ	НТ	818	НТ	2632	НТ	3169	
	≥10 мкм	7	НТ	НТ	13	НТ	27	НТ	21	
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	0	НТ	0	НТ	4	
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	104	101	100	101	101	101	99	
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	97,7	НТ	НТ	96,4	НТ	96,8	НТ	96,8	
	Восстанавливающие	99,7	НТ	НТ	99,9	НТ	99,9	НТ	99,9	

	условия; % тяжелой+л егкой цепи									
Чистота по данным SE- СВЭЖХ	ВМ, %	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	
	Нативная форма, %	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,5	99,2	99,4	
	НМ, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	
Анализ вариант ов с изменен ным зарядом по данным СЕХ- СВЭЖХ	Кислая форма, %	14,0	14,4	16,3	14,1	13,6	15,8	14,3	16,1	
	Главная форма, %	39,1	37,8	35,0	35,2	34,6	34,4	36,3	35,2	
	Щелочная форма, %	46,9	47,8	48,6	50,7	51,8	49,8	49,4	48,8	
Анализ вариант ов с изменен ным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	20,3	НТ	НТ	19,8	НТ	21,1	НТ	21,3	
	Главная форма, %	70,8	НТ	НТ	71,7	НТ	69,6	НТ	68,9	
	Щелочная форма, %	8,9	НТ	НТ	8,5	НТ	9,3	НТ	9,8	
% относительной активности по биоанализу		92	НТ	НТ	118	НТ	108	108	77	

СЕХ - катионный обмен; ЛС - лекарственная субстанция; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 7. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 при хранении при 5°C

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8 (под слоем азота)								
<b>Объем фасовки</b>		5,5 мл								
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West V10W-F597W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®								
<b>Продолжительность хранения при 5 °С (месяцы)</b>										
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>36</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
pH		5,8	5,8	5,8	5,9	5,9	5,8	5,8	5,9	
Анализ размера частиц методом МФИ (частиц/мл)	2-10 мкм	299	НТ	НТ	403	НТ	865	НТ	3810	
	≥10 мкм	9	НТ	НТ	7	НТ	23	НТ	6	
	≥25 мкм	3	НТ	НТ	3	НТ	2	НТ	2	
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	105	101	100	101	101	101	98	
Чистота по данным МКЭ		Невосстановившиеся условия; % главного	96,8	НТ	НТ	97,2	НТ	97,0	НТ	96,9

	пика									
	Восстан авливаю щие условия; % тяжелой +легкой цепи	99,5	НТ	НТ	99,7	НТ	99,9	НТ	99,9	
Чистота по данным SE- СВЭЖХ	ВМ, %	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	
	Нативна я форма, %	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,5	99,2	99,4	
	НМ, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	
Анализ вариант ов с изменен ным зарядом по данным СЕХ- СВЭЖХ	Кислая форма, %	14,8	15,5	15,8	14,0	13,2	15,6	14,8	15,0	
	Главная форма, %	38,5	37,7	34,6	35,2	35,5	34,8	35,2	35,9	
	Щелочн ая форма, %	46,8	46,8	49,6	50,8	51,3	49,6	49,9	49,1	
Анализ вариант ов с изменен ным зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	21,8	НТ	НТ	20,5	НТ	21,0	НТ	20,9	
	Главная форма, %	70,2	НТ	НТ	70,4	НТ	69,6	НТ	69,3	
	Щелочн ая форма, %	8,0	НТ	НТ	9,2	НТ	9,5	НТ	9,8	
% относительной активности по биоанализу		56	НТ	НТ	95	НТ	123	НТ	78	

СЕХ - катионный обмен; ЛС - лекарственная субстанция; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 8. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 - влияние условий ускоренного разложения

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8 (под слоем азота)						
<b>Объем фасовки</b>		1,2 мл						
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West V2-F451W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®						
		<b>Хранение при 25 °C/60% ОВ (месяцы)</b>				<b>Хранение при 45 °C (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
pH		5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,8	5,8
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	272	НТ	НТ	643	НТ	НТ	996
	≥10 мкм	7	НТ	НТ	15	НТ	НТ	38
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	0	НТ	НТ	5
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	104	101	100	99	105	100

Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	97,7	НТ	НТ	95,1	НТ	НТ	93,4
	Восстанавливающие условия; % тяжелой+ легкой цепи	99,7	НТ	НТ	99,2	НТ	НТ	97,3
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,9	2,6
	Нативная форма, %	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	98,8	96,8
	НМ, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,6
Анализ вариантов в с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	14,0	15,2	18,8	23,2	27,4	37,6	СР
	Главная форма, %	39,1	37,4	30,7	26,4	23,9	17,3	СР
	Щелочная форма, %	46,9	47,4	50,5	50,4	48,7	45,2	СР
Анализ вариантов в с измененным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	20,3	НТ	НТ	27,1	НТ	НТ	СР
	Главная форма, %	70,8	НТ	НТ	59,0	НТ	НТ	СР
	Щелочная форма, %	8,9	НТ	НТ	13,9	НТ	НТ	СР

СЕХ - катионный обмен; ЛС - лекарственная субстанция; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 9. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 - влияние условий ускоренного разложения

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,8 (под слоем азота)						
<b>Объем фасовки</b>		5,5 мл						
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West V10W-F597W 4432/50 GRV B2-TR диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®						
		<b>Хранение при 25 °С/60% ОВ (месяцы)</b>				<b>Хранение при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
рН		5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,8	5,8
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	299	НТ	НТ	351	НТ	НТ	881
	≥10 мкм	9	НТ	НТ	11	НТ	НТ	21
	≥25 мкм	3	НТ	НТ	5	НТ	НТ	3
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	104	101	100	99	104	100
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	96,8	НТ	НТ	95,5	НТ	НТ	93,6

СЕХ - катионный обмен; ЛС - лекарственная субстанция; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; МFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 10. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 - влияние стрессовых условий

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8 (под слоем азота)				
<b>Объем фасовки</b>		1,2 мл				
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West V2-F451W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®				
		<b>Перемешивание (минуты)</b>			<b>Замораживание/размораживание (циклы)</b>	
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	272	НТ	268	НТ	10327
	≥10 мкм	7	НТ	29	НТ	75
	≥25 мкм	0	НТ	21	НТ	16
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	100	100	106	99
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	97,7	НТ	96,8	НТ	96,8
	Восстанавливающие условия; % тяжелой+ легкой цепи	99,7	НТ	99,8	НТ	99,9
Чистота	ВМ, %	0,6	0,7	0,7	0,8	0,7

по данным SE-СВЭЖХ	Нативная форма, %	99,4	99,3	99,4	99,2	99,3
	НМ, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Анализ вариантов в измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	14,0	13,4	13,6	13,5	13,6
	Главная форма, %	39,1	35,1	35,0	35,9	35,3
	Щелочная форма, %	46,9	51,6	51,4	50,5	51,2
Анализ вариантов в измененным зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	20,3	НТ	20,9	НТ	20,6
	Главная форма, %	70,8	НТ	69,6	НТ	69,6
	Щелочная форма, %	8,9	НТ	10,0	НТ	9,6

СЕХ - катионный обмен; ЛС - лекарственная субстанция; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 11. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 - влияние стрессовых условий

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 mM гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8 (под слоем азота)				
Объем фасовки		5,5 мл				
Контейнер/средство укупорки		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West V10W-F597W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®				
		<b>Перемешивание (минуты)</b>			<b>Замораживание/размораживание (циклы)</b>	
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	299	НТ	3742	НТ	5606
	≥10 мкм	9	НТ	21	НТ	18
	≥25 мкм	3	НТ	0	НТ	0
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	100	100	100	100
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	96,8	НТ	97,8	НТ	97,2
	Восстанавливающие условия; % тяжелой+ легкой цепи	99,5	НТ	99,4	НТ	99,7
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	Нативная форма, %	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
	НМ, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Анализ варианто в с измененн ым зарядом по данным СЕХ- СВЭЖХ	Кислая форма, %	14,8	12,6	13,3	12,6	12,8
	Главная форма, %	38,5	36,7	36,1	36,7	36,4
	Щелочная форма, %	46,8	50,8	50,6	50,7	50,8
Анализ варианто в с измененн ым зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	21,8	НТ	21,0	НТ	21,9
	Главная форма, %	70,2	НТ	69,8	НТ	68,8
	Щелочная форма, %	8,0	НТ	9,2	НТ	9,3

СЕХ - катионный обмен; ЛС - лекарственная субстанция; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; МFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Результаты исследований стабильности при хранении в условиях ускоренного разложения и в стрессовых условиях указывают на то, что REGN1979 будет стабильным в процессе производства (изготовление состава, фасовка/упаковка и нанесение этикетки) и могут выдерживать кратковременное хранение при комнатной температуре без отрицательного влияния на физическую или химическую стабильность.

Были проведены дополнительные эксперименты для исследования стабильности для составов, содержащих 2 мг/мл, 20 мг/мл, 100 мг/мл и 160 мг/мл биспецифичного антитела (REGN1979) с 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80 и рН 5,8. Результаты показаны в табл. 12-27 ниже. НС=не сообщается; НД=степень разложения не позволила провести анализ.

Таблица 12. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 2 мг/мл (5% O<sub>2</sub> в свободном пространстве) при хранении при 5 °С

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8, 5% O <sub>2</sub> в свободном пространстве								
<b>Объем фасовки</b>		1,2 мл								
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West V2-F451W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®								
		Продолжительность хранения при 5 °С (месяцы)								
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>36</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено			
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00			
pH		5,8	5,9	5,9	5,8	5,8	5,8			
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	6	НТ	НТ	11	НТ	21			
	≥25 мкм	1	НТ	НТ	0	НТ	1			
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	146	НТ	НТ	847	НТ	1076			
	≥10 мкм	4	НТ	НТ	23	НТ	8			
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	4	НТ	2			
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	102	100	103	108	106			

Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	97,2	НТ	НТ	97,0	НТ	97,2			
	Восстанавливающие условия; % тяжелой+ легкой цепи	98,3	НТ	НТ	97,9	НТ	98,5			
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7			
	Нативная форма, %	99,1	99,1	99,1	99,2	99,2	99,2			
	НМ, %	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0			
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	13,8	13,2	13,4	12,7	13,2	14,5			
	Главная форма, %	37,3	36,7	36,4	36,3	36,4	36,9			
	Щелочная форма, %	49,0	50,2	50,2	50,9	50,4	48,6			
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	24,2	НТ	НТ	25,2	НТ	27,0			
	Главная форма, %	61,7	НТ	НТ	59,8	НТ	59,2			
	Щелочная форма, %	14,1	НТ	НТ	15,0	НТ	13,8			
% относительной активности по биоанализу		131	НТ	НТ	103	НТ	98			

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 13. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 2 мг/мл (5% O<sub>2</sub> в свободном пространстве) - влияние условий ускоренного разложения

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8, 5% O <sub>2</sub> в свободном пространстве						
<b>Объем фасовки</b>		1,2 мл						
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West V2-F451W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®						
		Хранение при 25 °C/60% ОВ (месяцы)				Хранение при 45 °C (месяцы)		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
pH		5,8	5,9	5,9	5,8	5,9	5,9	5,9
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	6	НТ	НТ	6	НТ	НТ	13
	≥25 мкм	1	НТ	НТ	0	НТ	НТ	1
Анализ размера частиц методом МFI	2-10 мкм	146	НТ	НТ	2354	НТ	НТ	522
	≥10 мкм	4	НТ	НТ	23	НТ	НТ	29
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	10	НТ	НТ	0

(частиц/мл)								
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	101	100	103	99	101	99
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавли- вающие условия; % главного пика	97,2	НТ	НТ	95,6	НТ	НТ	89,9
	Восстанавлива- ющие условия; % тяжелой+ легкой цепи	98,3	НТ	НТ	98,5	НТ	НТ	97,7
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	0,8	0,8	0,8	0,8	1,2	1,8	9,0
	Нативная форма, %	99,1	99,2	99,1	99,2	98,6	98,0	90,3
	НМ, %	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,7
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ- СВЭЖХ	Кислая форма, %	13,8	12,8	14,2	22,4	27,7	38,8	СР
	Главная форма, %	37,3	36,5	36,0	27,2	26,4	14,9	СР
	Щелочная форма, %	49,0	50,7	49,7	50,4	45,9	46,2	СР
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	24,2	НТ	НТ	30,0	НТ	НТ	СР
	Главная форма, %	61,7	НТ	НТ	49,4	НТ	НТ	СР
	Щелочная форма, %	14,1	НТ	НТ	20,6	НТ	НТ	СР

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; МFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СР - степень разложения не позволила провести анализ; СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 14. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 2 мг/мл (5% O<sub>2</sub> в свободном пространстве) - влияние стрессовых условий

<b>Состав</b>		2 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,8 (под слоем азота)				
<b>Объем фасовки</b>		1,2 мл				
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West V2-F451W 4432/50 GRV B2-TR диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®				
			<b>Перемешивание (часы)</b>		<b>Замораживание/размораживание (циклы)</b>	
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		5,8	5,8	5,8	5,8	5,9
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	6	НТ	2	НТ	НТ
	≥25 мкм	1	НТ	1	НТ	НТ
Анализ размера	2-10 мкм	146	НТ	165	НТ	1625
	≥10 мкм	4	НТ	2	НТ	25

частиц методом MFI (частиц/мл)	≥25 мкм	0	НТ	0	НТ	4
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	100	100	101	101
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавли- вающие условия; % главного пика	97,2	НТ	97,3	НТ	97,1
	Восстанавлива- ющие условия; % тяжелой+ легкой цепи	98,3	НТ	98,5	НТ	98,5
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	Нативная форма, %	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1
	НМ, %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ- СВЭЖХ	Кислая форма, %	13,8	13,5	13,9	13,4	13,0
	Главная форма, %	37,3	37,4	37,7	35,5	36,5
	Щелочная форма, %	49,0	49,1	48,4	51,1	50,4
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	24,2	НТ	24,0	НТ	24,0
	Главная форма, %	61,7	НТ	61,2	НТ	61,9
	Щелочная форма, %	14,1	НТ	14,8	НТ	14,1

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 15. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 20 мг/мл при хранении при 5°C - фасовка по 4,5 мл в стеклянный флакон объемом 10 мл

<b>Состав</b>		20 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8								
<b>Объем фасовки</b>		4,5 мл								
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®								
<b>Продолжительность хранения при 5 °С (месяцы)</b>										
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>36</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено			
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
pH		5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,8			
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	3	НТ	НТ	16	НТ	3			
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	1	НТ	1			
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	293	НТ	НТ	3253	НТ	754			
	≥10 мкм	3	НТ	НТ	10	НТ	2			
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	2	НТ	0			

л)										
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	102	99	96	96	105			
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	96,5	НТ	НТ	96,4	НТ	96,9			
	Восстанавливающие условия; % тяжелой+легкой цепи	98,2	НТ	НТ	98,1	НТ	98,0			
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,2	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2			
	Нативная форма, %	98,1	98,5	98,4	98,3	98,5	98,1			
	НМ, %	0,7	0,4	0,4	0,6	0,3	0,7			
Анализ вариантов в измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	15,1	15,3	16,6	17,8	16,8	15,8			
	Главная форма, %	33,3	33,4	29,6	32,2	30,1	30,8			
	Щелочная форма, %	51,6	51,3	53,8	49,9	53,2	53,3			
Анализ вариантов в измененным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	23,8	НТ	НТ	23,8	НТ	26,2			
	Главная форма, %	61,6	НТ	НТ	61,6	НТ	59,1			
	Щелочная форма, %	14,7	НТ	НТ	14,6	НТ	14,7			
% относительной активности по биоанализу		133	НТ	НТ	106	НТ	120			

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 16. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 20 мг/мл фасовка по 4,5 мл в стеклянный флакон объемом 10 мл - влияние условий ускоренного разложения

<b>Состав</b>		20 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,8						
<b>Объем фасовки</b>		4,5 мл						
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®						
		<b>Хранение при 25 °С/60% ОВ (месяцы)</b>				<b>Хранение при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03
рН		5,8	5,9	5,9	5,8	5,9	5,9	5,8
Анализ	≥10 мкм	3	НТ	НТ	4	НТ	НТ	28

размера частиц методом НИАС (частиц/мл)	≥25 мкм	0	НТ	НТ	1	НТ	НТ	1
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	293	НТ	НТ	2900	НТ	НТ	3645
	≥10 мкм	3	НТ	НТ	10	НТ	НТ	42
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	0	НТ	НТ	0
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	103	100	95	101	102	99
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	96,5	НТ	НТ	96,2	НТ	НТ	90,2
	Восстанавливающие условия; % тяжелой+ легкой цепи	98,2	НТ	НТ	97,8	НТ	НТ	91,5
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,2	1,1	1,2	1,3	1,7	2,8	9,9
	Нативная форма, %	98,1	98,5	98,5	98,0	97,9	96,4	88,3
	НМ, %	0,7	0,4	0,3	0,8	0,4	0,8	1,7
Анализ вариантов в с измененным	Кислая форма, %	15,1	16,2	19,8	22,5	25,8	39	СР
	Главная форма, %	33,3	32,1	26,3	27,7	20,7	13,5	СР
	Щелочная	51,6	51,7	53,9	49,8	53,5	47,5	СР
зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	форма, %							
Анализ вариантов в с измененным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	23,8	НТ	НТ	29,3	НТ	НТ	СР
	Главная форма, %	61,6	НТ	НТ	50,6	НТ	НТ	СР
	Щелочная форма, %	14,7	НТ	НТ	20,1	НТ	НТ	СР

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СР - степень разложения не позволила провести анализ; СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 17. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 20 мг/мл - фасовка по 4,5 мл в стеклянный флакон объемом 10 мл - влияние стрессовых условий

<b>Состав</b>	20 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8				
<b>Объем фасовки</b>	4,5 мл				
<b>Контейнер/средство укупорки</b>	Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®				
		<b>Перемешивание (часы)</b>		<b>Замораживание/размораживание (циклы)</b>	
<b>Анализ</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
Исследование цвета и внешнего вида	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено

Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
рН		5,8	5,8	5,9	5,9	5,9
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	3	НТ	33	НТ	НТ
	≥25 мкм	0	НТ	1	НТ	НТ
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	293	НТ	3580	НТ	5563
	≥10 мкм	3	НТ	46	НТ	15
	≥25 мкм	0	НТ	3	НТ	3
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	99	100	98	99
Чистота по данным МКЭ	Невосстана вливающие условия; % главного пика	96,5	НТ	96,7	НТ	96,8
	Восстанавл ивающие условия; % тяжелой+легкой цепи	98,2	НТ	98,2	НТ	98,2
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,2	1,1	1,1	1,2	1,2
	Нативная форма, %	98,1	98,3	98,4	98,3	98,4
	НМ, %	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	15,1	13,4	15,2	15,6	15,3
	Главная форма, %	33,3	32,5	30,6	33,5	33,2
	Щелочная форма, %	51,6	54,1	54,2	50,9	51,5
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	23,8	НТ	23,7	НТ	23,3
	Главная форма, %	61,6	НТ	61,6	НТ	62,5
	Щелочная форма, %	14,7	НТ	14,7	НТ	14,2

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; МFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влаж-

ность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СР - степень разложения не позволила провести анализ; СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 18. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 160 мг/мл при хранении при 5°C - фасовка по 8,5 мл в стеклянный флакон объемом 10 мл

<b>Состав</b>		20 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,8								
<b>Объем фасовки</b>		8,5 мл								
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRV B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®								
		<b>Продолжительность хранения при 5 °С (месяцы)</b>								
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>36</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено			
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
рН		5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,8			
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	1	НТ	НТ	4	НТ	4			
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	0	НТ	0			
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	724	НТ	НТ	1059	НТ	690			
	≥10 мкм	34	НТ	НТ	0	НТ	2			
	≥25 мкм	5	НТ	НТ	0	НТ	2			
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	102	99	95	96	102			
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия, % главного пика	97,0	НТ	НТ	97,0	НТ	97,2			
	Восстанавливающие условия, % тяжелой+легкой цепи	97,8	НТ	НТ	97,0	НТ	97,6			
Чистота	ВМ, %	1,2	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2			

по данным SE-СВЭЖХ	Нативная форма, %	98,2	98,5	98,5	98,2	98,5	98,4			
	НМ, %	0,6	0,4	0,4	0,6	0,3	0,5			
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	15,4	15,0	14,5	14,8	16,2	15,4			
	Главная форма, %	34,4	34,1	33,9	34,3	29,2	32,4			
	Щелочная форма, %	50,2	50,9	51,7	50,9	54,6	52,2			
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	24,0	НТ	НТ	29,3	НТ	26,2			
	Главная форма, %	61,6	НТ	НТ	51,0	НТ	60,0			
	Щелочная форма, %	14,4	НТ	НТ	19,7	НТ	13,9			
% относительной активности по биоанализу	115	НТ	НТ	103	НТ	119				

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 19. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 160 мг/мл - фасовка по 8,5 мл в стеклянный флакон объемом 10 мл - влияние условий ускоренного разложения

Состав		20 мг/мл REGN1979, 10 mM гистидина, 10% (мас./об.)						
		сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8						
Объем фасовки		8,5 мл						
Контейнер/средство укупорки		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®						
		Хранение при 25 °C/60% ОВ (месяцы)				Хранение при 45 °C (месяцы)		
Анализ		0	1	3	6	0,5	1	3
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03
pH		5,8	5,8	5,8	5,9	5,9	5,9	5,8
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	1	НТ	НТ	3	НТ	НТ	23
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	0	НТ	НТ	1
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	724	НТ	НТ	1357	НТ	НТ	1654
	≥10 мкм	34	НТ	НТ	4	НТ	НТ	9
	≥25 мкм	5	НТ	НТ	0	НТ	НТ	0
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	103	99	95	100	101	99
Чистота по данным МКЭ	Невосстана вливающие условия, % главного пика	97,0	НТ	НТ	96,0	НТ	НТ	91,5
	Восстанавл	97,8	НТ	НТ	97,9	НТ	НТ	93,9

	ивающие условия; % тяжелой+легкой цепи							
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,2	1,1	1,2	1,2	1,7	2,7	10,1
	Нативная форма, %	98,2	98,6	98,5	98,2	97,9	96,5	88,2
	НМ, %	0,6	0,4	0,4	0,6	0,4	0,8	1,8
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	15,4	16,2	19,8	23,2	25,4	38,8	СР
	Главная форма, %	34,4	33,3	28,0	26,8	22,0	13,9	СР
	Щелочная форма, %	50,2	50,5	52,2	50,0	52,6	47,2	СР
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	24,0	НТ	НТ	24,1	НТ	НТ	СР
	Главная форма, %	61,6	НТ	НТ	61,4	НТ	НТ	СР
	Щелочная форма, %	14,4	НТ	НТ	14,6	НТ	НТ	СР

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СР - степень разложения не позволила провести анализ; СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 20. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 160 мг/мл - фасовка по 8,5 мл в стеклянный флакон объемом 10 мл - влияние стрессовых условий

<b>Состав</b>		20 мг/мл REGN1979, 10 mM гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8				
<b>Объем фасовки</b>		8,5 мл				
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 10 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®				
		<b>Перемешивание (часы)</b>			<b>Замораживание/размораживание (циклы)</b>	
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		5,8	5,8	5,9	5,9	5,9
Анализ размера частиц методом НИАС (частиц/мл)	≥10 мкм	1	НТ	13	НТ	НТ
	≥25 мкм	0	НТ	1	НТ	НТ
Анализ размера частиц методом МГІ (частиц/мл)	2-10 мкм	724	НТ	1658	НТ	2340
	≥10 мкм	34	НТ	9	НТ	5
	≥25 мкм	5	НТ	0	НТ	0
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	99	103	100	99
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	97,0	НТ	97,0	НТ	97,0
	Восстанавливающие условия;	97,8	НТ	97,9	НТ	98,1

	% тяжелой+л егкой цепи					
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,2	1,1	1,1	1,2	1,2
	Нативная форма, %	98,2	98,4	98,4	98,4	98,3
	НМ, %	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ- СВЭЖХ	Кислая форма, %	15,4	14,3	14,8	15,1	15,4
	Главная форма, %	34,4	33,8	34,0	34,5	33,9
	Щелочная форма, %	50,2	51,9	51,1	50,4	50,7
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	24,0	НТ	25,1	НТ	24,3
	Главная форма, %	61,6	НТ	60,2	НТ	61,8
	Щелочная форма, %	14,4	НТ	14,7	НТ	14,0

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 21. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 100 мг/мл при хранении при 5°C

<b>Состав</b>	<b>100 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8</b>
<b>Объем фасовки</b>	<b>2,5 мл</b>
<b>Контейнер/средство укупорки</b>	<b>Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 5 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®</b>

Анализ		Продолжительность хранения при 5 °С (месяцы)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено			
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
рН		5,9	5,8	5,9	5,8	5,9	5,8			
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	4	НТ	НТ	59	НТ	3			
	≥25 мкм	1	НТ	НТ	1	НТ	1			
Анализ размера частиц методом МFІ (частиц/мл)	2-10 мкм	3213	НТ	НТ	3524	НТ	4539			
	≥10 мкм	4	НТ	НТ	48	НТ	15			
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	6	НТ	0			
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	102	99	100	100	97			
Чистота по данным МКЭ	Невосстанавливающие условия; % главного пика	96,3	НТ	НТ	96,3	НТ	96,4			
	Восстанавливающие	98,3	НТ	НТ	98,4	НТ	98,4			

	ие условия, % тяжелой+ легкой цепи									
Чистота по данным SE- СВЭЖХ	ВМ, %	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,5			
	Нативная форма, %	98,3	98,2	98,2	98,1	98,0	98,0			
	НМ, %	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5			
Анализ вариантов с измененн ым зарядом по данным СЕХ- СВЭЖХ	Кислая форма, %	11,5	11,2	11,5	10,7	11,7	12,0			
	Главная форма, %	37,4	35,9	37,4	38,7	37,0	34,2			
	Щелочна я форма, %	51,1	52,9	51,1	50,7	51,2	53,8			
Анализ вариантов с измененн ым зарядом по данным iСIEF	Кислая форма, %	23,8	НТ	НТ	23,8	НТ	26,5			
	Главная форма, %	59,9	НТ	НТ	59,9	НТ	58,6			
	Щелочна я форма, %	16,3	НТ	НТ	16,3	НТ	15,0			
% относительной активности по биоанализу		114	НТ	НТ	127	НТ	102			

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iСIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микроциповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 22. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 100 мг/мл - влияние условий ускоренного разложения

<b>Состав</b>		100 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,8						
<b>Объем фасовки</b>		2,5 мл						
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 5 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®						
		<b>Хранение при 25 °С/60% ОВ (месяцы)</b>				<b>Хранение при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,03	0,12
рН		5,9	5,8	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	4	НТ	НТ	18	НТ	НТ	11
	≥25 мкм	1	НТ	НТ	0	НТ	НТ	0
Анализ размера частиц методом MFI	2-10 мкм	3213	НТ	НТ	3524	НТ	НТ	3667
	≥10 мкм	4	НТ	НТ	21	НТ	НТ	92
	≥25 мкм	0	НТ	НТ	6	НТ	НТ	2

(частиц/мл)								
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	102	100	100	100	103	95
Чистота по данным МКЭ	Невосстановливающие условия; % главного пика	96,3	НТ	НТ	95,1	НТ	НТ	86,0
	Восстанавливающие условия; % тяжелой+ легкой цепи	98,3	НТ	НТ	97,9	НТ	НТ	91,5
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,3	1,5	1,7	1,9	3,3	5,6	20,3
	Нативная форма, %	98,3	98,1	97,9	97,4	96,0	93,4	78,2
	НМ, %	0,4	0,4	0,4	0,8	0,7	1,0	1,5
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	11,5	11,0	12,4	21,4	25,6	33,7	СР
	Главная форма, %	37,4	35,8	36,1	27,8	24,6	16,1	СР
	Щелочная форма, %	51,1	53,2	51,5	50,9	49,8	50,2	СР
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	23,8	НТ	НТ	29,3	НТ	НТ	СР
	Главная форма, %	59,9	НТ	НТ	48,3	НТ	НТ	СР
Щелочная форма, %	16,3	НТ	НТ	22,4	НТ	НТ	СР	

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СР - степень разложения не позволила провести анализ; СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 23. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 100 мг/мл - влияние стрессовых условий

Состав		100 мг/мл REGN1979, 10 mM гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8				
Объем фасовки		2,5 мл				
Контейнер/средство укупорки		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 5 мл с пробками West S10-F451 4432/50 GRY B2-40 диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®				
		Перемешивание (часы)			Замораживание/размораживание (циклы)	
Анализ		0	24	48	4	8
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
pH		5,9	5,8	5,8	5,8	5,9
Анализ размера частиц методом НІАС (частиц/мл)	≥10 мкм	4	НТ	15	НТ	НТ
	≥25 мкм	1	НТ	1	НТ	НТ

Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	3213	НТ	202	НТ	6318
	≥10 мкм	4	НТ	10	НТ	8
	≥25 мкм	0	НТ	2	НТ	0
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	101	102	102	101
Чистота по данным МКЭ	Невосстана вливающие условия; % главного пика	96,3	НТ	96,3	НТ	96,3
	Восстанавл ивающие условия; % тяжелой+легкой цепи	98,3	НТ	98,4	НТ	98,4
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4
	Нативная форма, %	98,3	98,3	98,3	98,1	98,1
	НМ, %	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-	Кислая форма, %	11,5	12,1	12,1	11,4	11,7
	Главная форма, %	37,4	38,7	39,5	35,3	37,6
	Щелочная форма, %	51,1	49,2	48,5	53,3	50,7
СВЭЖХ						
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным iCIEF	Кислая форма, %	23,8	НТ	23,4	НТ	24,1
	Главная форма, %	59,9	НТ	59,9	НТ	59,8
	Щелочная форма, %	16,3	НТ	16,7	НТ	16,1

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; iCIEF - динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование; НМ - низкомолекулярный; МКЭ - микрочиповый капиллярный электрофорез; MFI - визуализация микропотоков; НТ - не требуется; ОП - оптическая плотность; ОВ - относительная влажность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 24. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 160 мг/мл при хранении при 5°C

Состав	160 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,8								
Объем фасовки	1,2 мл								
Контейнер/средство укупорки	Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West S2 F451 4432/50 B2 40 диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®								
	Продолжительность хранения при 5 °С (месяцы)								
Анализ	0	1	3	6	9	12	18	24	36
Исследование цвета и внешнего вида	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено		
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,07	0,00		
рН	5,7	5,9	5,8	5,9	5,9	5,7	5,8		
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ	100	99	96	98	94	94	95		
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,1	1,3	1,3	1,4	1,5	1,1	1,6	
	Нативная форма, %	98,8	98,4	98,6	98,4	98,3	98,4	98,1	
	НМ, %	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2	0,6	0,2	
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,0	12,0	13,0	12,5	13,3	13,8	12,6	
	Главная форма, %	38,0	37,2	38,6	39,7	39,7	39,1	39,2	
	Щелочная форма, %	50,0	50,8	48,4	47,8	47,0	47,1	48,2	

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; НМ - низкомолекулярный; ОП - оптическая плотность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 25. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 160 мг/мл после хранения - влияние условий ускоренного разложения

<b>Состав</b>		160 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8						
<b>Объем фасовки</b>		1,2 мл						
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 2 мл с пробками West S2 F451 4432/50 B2 40 диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®						
		<b>Хранение при 25 °С/60% ОВ (месяцы)</b>			<b>Хранение при 45 °С (месяцы)</b>			
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,14
pH		5,8	5,9	5,9	5,9	5,8	5,9	5,9
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	98	94	97	97	99	93
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,1	1,6	1,9	2,2	3,5	5,8	20,5
	Нативная форма, %	98,8	98,1	97,6	97,4	96,0	93,4	78,0
	НМ, %	0,1	0,4	0,6	0,3	0,5	0,6	1,6
Анализ вариантов в с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,0	11,8	14,8	16,6	22,5	34,5	49,6
	Главная форма, %	38,0	36,6	36,9	35,9	24,2	17,6	15,5
	Щелочная форма, %	50,0	51,5	48,3	47,5	53,3	47,9	35,0

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; НМ - низкомолекулярный; ОП - оптическая плотность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 26. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 80 мг/мл при хранении при 5°C

<b>Состав</b>		80 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 5,8	
<b>Объем фасовки</b>		2,5 мл	
<b>Контейнер/средство укупорки</b>		Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 5 мл с пробками West S10 F451 4432/50 B2 40 диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®	

		покрытием FluroTec®								
		Продолжительность хранения при 5 °С (месяцы)								
Анализ		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено		
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
рН		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8		
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	101	103	99	97	99	98		
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	1,2	1,3		
	Нативная форма, %	98,9	98,6	98,8	98,5	98,6	98,5	98,6		
	НМ, %	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2		
Анализ вариантов в измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,1	11,6	13,1	13,5	13,5	13,5	13,2		
	Главная форма, %	36,9	37,4	38,7	39,0	39,0	39,2	39,1		
	Щелочная форма, %	50,9	51,0	48,2	47,5	47,5	47,3	47,7		

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; НМ - низкомолекулярный; ОП - оптическая плотность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Таблица 27. Исследование стабильности лекарственного препарата REGN1979 с концентрацией 80 мг/мл после хранения - влияние условий ускоренного разложения

<b>Состав</b>	80 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 10% (мас./об.) сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,8						
<b>Объем фасовки</b>	2,5 мл						
<b>Контейнер/средство укупорки</b>	Флаконы I типа из боросиликатного стекла объемом 5 мл с пробками West S10 F451 4432/50 B2 40 диаметром 13 мм с покрытием FluroTec®						
		<b>Хранение при 25 °С/60% ОВ (месяцы)</b>			<b>Хранение при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Исследование цвета и внешнего вида	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,08
рН	5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,9	5,8
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ	100	99	103	100	101	100	98
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	1,0	1,2	1,4	1,5	2,3	14,7
	Нативная форма, %	98,9	98,4	98,3	98,1	97,3	83,5
	НМ, %	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	1,6
Анализ вариантов в измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,1	11,6	14,6	25,6	22,8	25,3
	Главная форма, %	36,9	36,9	37,4	27,2	24,5	19,5
	Щелочная форма, %	50,9	51,5	48,1	47,2	52,7	55,2
СВЭЖХ							

СЕХ - катионный обмен; ВМ - высокомолекулярный; НМ - низкомолекулярный; ОП - оптическая плотность; ОФ - обращенно-фазовая (хроматография); SE - эксклюзионная (хроматография); СВЭЖХ - сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

Были проведены дополнительные исследования стабильности с различными другими вспомогательными веществами при концентрации биспецифичного антитела (REGN1979) 100 мг/мл. Различные составы (F1-F13) показаны в табл. 28 ниже. Результаты этих экспериментов по исследованию стабильности приведены в табл. 29-41. В каждом из этих экспериментов контейнер/средство укупорки представляли собой флакон I типа из боросиликатного стекла объемом 5 мл с пробкой West V2-F451W 4432/50 GRY B2-TR диаметром 20 мм с покрытием FluroTec®.

Таблица 28. Дополнительные оцененные составы

Состав №	Буфер	Поверхностно-активное вещество	Стабилизатор	pH
F1	10 мМ гистидина	0,1% PS20	150 мМ ArgHCl	6,0
F2	10 мМ гистидина	0,1% PS20	5% сорбита	5,5
F3	10 мМ сукцината	0,1% PS20	150 мМ NaCl	6,0
F4	10 мМ ацетата	0,1% PS80	150 мМ ArgHCl	6,2
F5	10 мМ ацетата	0,1% полоксамера 88	5% сорбита	5,7
F6	10 мМ гистидина	0,1% PS80	150 мМ NaCl	5,5
F7	10 мМ гистидина	0,1% PS80	5% сорбита	6,0
F8	10 мМ сукцината	0,1% полоксамера 88	150 мМ ArgHCl	5,5
F9	10 мМ сукцината	0,1% PS20	5% сорбита	6,5
F10	10 мМ ацетата	0,1% полоксамера 88	150 мМ NaCl	6,2
F11	10 мМ ацетата	0,1% PS20	10% сахарозы	5,2
F12	10 мМ гистидина	0,1% полоксамера 88	10% сахарозы	6,5
F13	10 мМ сукцината	0,1% PS80	10% сахарозы	6,0

Таблица 29. Исследование стабильности состава F1 при хранении при 45°C

Состав	100 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 150 мМ аргинина HCl, 0,1% (мас./об.) полисорбата 20, pH 6,0		
Объем фасовки	2,5		
	Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)		
Анализ	0	0,5	1

Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Не пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,04	0,10
рН		6,1	6,1	6,2
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	101	НТ	563
	≥10 мкм	5	НТ	15
	≥25 мкм	0	НТ	3
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	98	100
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,5	8,2	14,8
	Нативная форма, %	97,2	91,1	84,2
	НМ, %	0,3	0,7	1,1
Анализ вариантов с изменением зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,1	26,0	35,8
	Главная форма, %	35,3	22,3	14,8
	Щелочная форма, %	52,6	51,7	49,4

Таблица 30. Исследование стабильности состава F2 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>		100 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,1% (мас./об.) полисорбата 20, pH 5,5		
<b>Объем фасовки</b>		2,5		
		<b>Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,2
pH		5,7	5,7	5,8
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	140	НТ	1685
	≥10 мкм	11	НТ	40
	≥25 мкм	7	НТ	13
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	95	99
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,4	4,5	7,4
	Нативная форма, %	97,3	94,9	91,7
	НМ, %	0,3	0,6	0,8
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,5	29,6	37,6
	Главная форма, %	34,0	17,9	12,5
	Щелочная форма, %	53,5	52,5	49,9

Таблица 31. Исследование стабильности состава F3 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>	100 мг/мл REGN1979, 10 мМ сукцината, 150 мМ хлорида натрия, 0,1% (мас./об.) полисорбата 20, pH 6,0
<b>Объем фасовки</b>	2,5

Анализ		Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)		
		0	0,5	1
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Не пройдено	Не пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,06	0,15
рН		5,9	5,9	6,0
Анализ размера частиц методом МПГ (частиц/мл)	2-10 мкм	2256	НТ	1299
	≥10 мкм	167	НТ	50
	≥25 мкм	17	НТ	15
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	96	98
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,7	8,2	13,8
	Нативная форма, %	97,1	91,9	85,3
	НМ, %	0,3	0,7	1,1
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,8	25,3	36,4
	Главная форма, %	33,5	21,9	14,2
	Щелочная форма, %	53,7	52,9	49,4

Таблица 32. Исследование стабильности состава F4 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>		100 мг/мл REGN1979, 10 мМ ацетата, 150 мМ аргинина HCl, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, pH 6,2		
<b>Объем фасовки</b>		2,5		
		<b>Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Не пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,04	0,08
pH		6,1	6,1	6,3
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	48	НТ	1600
	≥10 мкм	11	НТ	42
	≥25 мкм	0	НТ	7
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	98	101
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,6	7,4	13,0
	Нативная форма, %	97,1	91,9	85,9
	НМ, %	0,3	0,7	1,1
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,2	25,5	36,0
	Главная форма, %	34,2	22,9	51,6
	Щелочная форма, %	36,0	14,8	49,2

Таблица 33. Исследование стабильности состава F5 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>		100 мг/мл REGN1979, 10 мМ ацетата, 5% сорбита, 0,1% (мас./об.) полоксамера 188, pH 5,7		
<b>Объем фасовки</b>		2,5		

Анализ		Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)		
		0	0,5	1
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,01
рН		5,7	5,8	5,7
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	40	НТ	1798
	≥10 мкм	3	НТ	25
	≥25 мкм	3	НТ	3
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	96	99
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,5	4,3	6,6
	Нативная форма, %	97,2	95,2	92,7
	НМ, %	0,3	0,5	0,8
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,6	26,4	37,8
	Главная форма, %	32,6	22,4	12,1
	Щелочная форма, %	54,8	51,3	50,1

Таблица 34. Исследование стабильности состава F6 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>		100 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 150 мМ хлорида натрия, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 5,5		
<b>Объем фасовки</b>		2,5		
		<b>Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Не пройдено	Не пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,08	0,21
рН		5,7	5,8	5,8
Анализ размера частиц методом МПГ (частиц/мл)	2-10 мкм	459	НТ	НД
	≥10 мкм	13	НТ	НД
	≥25 мкм	0	НТ	НД
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	96	99
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,5	4,3	16,7
	Нативная форма, %	97,1	95,0	82,4
	НМ, %	0,3	0,6	0,9
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,7	27,8	37,3
	Главная форма, %	32,7	20,3	12,6
	Щелочная форма, %	54,6	51,9	50,1

Таблица 35. Исследование стабильности состава F7 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>	100 мг/мл REGN1979, 10 мМ гистидина, 5% сорбита, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 6,0
<b>Объем фасовки</b>	2,5

Анализ		Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)		
		0	0,5	1
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,02
рН		6,1	6,2	6,2
Анализ размера частиц методом МФИ (частиц/мл)	2-10 мкм	71	НГ	3745
	≥10 мкм	3	НГ	15
	≥25 мкм	3	НГ	0
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	96	101
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,5	3,9	6,1
	Нативная форма, %	97,1	95,6	93,1
	НМ, %	0,3	0,5	0,8
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	13,3	25,9	36,0
	Главная форма, %	32,6	22,9	14,1
	Щелочная форма, %	54,1	51,2	49,9

Таблица 36. Исследование стабильности состава F8 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>		<b>100 мг/мл REGN1979, 10 мМ сукцината, 150 мМ</b>		
		<b>аргинина HCl, 0,1% (мас./об.) полоксамера 188, pH 5,5</b>		
<b>Объем фасовки</b>		<b>2,5</b>		
		<b>Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Не пройдено	Не пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,09	0,24
pH		5,5	5,5	5,5
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	171	НГ	1468
	≥10 мкм	3	НГ	15
	≥25 мкм	0	НГ	7
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	93	95
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,4	3,9	28,1
	Нативная форма, %	97,3	95,3	71,0
	НМ, %	0,3	0,6	0,9
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,7	30,1	39,7
	Главная форма, %	32,5	17,3	10,5
	Щелочная форма, %	54,8	52,6	49,9
СВЭЖХ				

Таблица 37. Исследование стабильности состава F9 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>		<b>100 мг/мл REGN1979, 10 мМ сукцината, 5% сорбита, 0,1% (мас./об.) полисорбата 20, pH 6,5</b>		
<b>Объем фасовки</b>		<b>2,5</b>		
		<b>Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,02	0,04
pH		6,3	6,3	6,4
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	272	НТ	309
	≥10 мкм	34	НТ	19
	≥25 мкм	13	НТ	15
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	99	105
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	3,0	5,1	7,8
	Нативная форма, %	96,8	94,4	91,4
	НМ, %	0,3	0,6	0,8
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	13,4	27,9	36,7
	Главная форма, %	32,6	18,9	14,3
	Щелочная форма, %	54,0	53,2	49,0
СВЭЖХ				

Таблица 38. Исследование стабильности состава F10 при хранении при 45°C

Состав		100 мг/мл REGN1979, 10 мМ ацетата, 150 мМ хлорида натрия, 0,1% (мас./об.) полоксамера 188, рН 6,2		
Объем фасовки		2,5		
		Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)		
Анализ		0	0,5	1
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Не пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,05	0,10
рН		6,2	6,2	6,3
Анализ размера частиц методом МFI (частиц/мл)	2-10 мкм	132	НТ	1691
	≥10 мкм	11	НТ	32
	≥25 мкм	3	НТ	3
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	97	101
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	3,0	6,9	11,0
	Нативная форма, %	96,7	92,4	88,2
	НМ, %	0,3	0,7	0,9
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	13,6	26,4	35,8
	Главная форма, %	31,8	21,0	14,4
	Щелочная форма, %	54,6	52,5	49,9
СВЭЖХ				

Таблица 39. Исследование стабильности состава F11 при хранении при 45°C

Состав		100 мг/мл REGN1979, 10 мМ ацетата, 10% сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 20, pH 5,2		
Объем фасовки		2,5		
		Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)		
Анализ		0	0,5	1
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,09
pH		5,2	5,2	5,3
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	184	НТ	1091
	≥10 мкм	17	НТ	5
	≥25 мкм	7	НТ	0
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	96	97
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,4	5,2	9,0
	Нативная форма, %	97,4	94,2	90,1
	НМ, %	0,3	0,6	0,9
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-	Кислая форма, %	13,4	32,6	41,9
	Главная форма, %	33,0	16,5	10,1
	Щелочная форма, %	53,6	50,9	48,1
СВЭЖХ				

Таблица 40. Исследование стабильности состава F12 при хранении при 45°C

Состав		100 мг/мл REGN1979, 10 mM гистидина, 10% сахарозы, 0,1% (мас./об.) полоксамера 188, pH 6,5		
Объем фасовки		2,5		
		Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)		
Анализ		0	0,5	1
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,03
pH		6,5	6,6	6,6
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	249	НТ	1639
	≥10 мкм	55	НТ	50
	≥25 мкм	11	НТ	11
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	99	104
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,7	3,8	5,7
	Нативная форма, %	97,0	95,6	93,5
	НМ, %	0,3	0,6	0,9
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-	Кислая форма, %	13,1	27,4	38,0
	Главная форма, %	33,6	22,3	14,4
	Щелочная форма, %	53,3	50,3	47,6
СВЭЖХ				

Таблица 41. Исследование стабильности состава F13 при хранении при 45°C

<b>Состав</b>		<b>100 мг/мл REGN1979, 10 мМ сукцината, 10% сахарозы, 0,1% (мас./об.) полисорбата 80, рН 6,0</b>		
<b>Объем фасовки</b>		<b>2,5</b>		
		<b>Продолжительность хранения при 45 °С (месяцы)</b>		
<b>Анализ</b>		<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
Исследование цвета и внешнего вида		Пройдено	Пройдено	Пройдено
Мутность (увеличение ОП при 405 нм)		0,00	0,01	0,01
рН		5,9	5,9	6,0
Анализ размера частиц методом MFI (частиц/мл)	2-10 мкм	73	НТ	1108
	≥10 мкм	15	НТ	55
	≥25 мкм	3	НТ	9
% Белка, выделенного путем ОФ-СВЭЖХ		100	96	101
Чистота по данным SE-СВЭЖХ	ВМ, %	2,6	4,2	6,4
	Нативная форма, %	97,1	95,2	92,8
	НМ, %	0,3	0,6	0,8
Анализ вариантов с измененным зарядом по данным СЕХ-СВЭЖХ	Кислая форма, %	12,8	25,9	37,8
	Главная форма, %	32,8	22,9	13,9
	Щелочная форма, %	54,4	51,2	48,3
СВЭЖХ				

## Пример 3. Вязкость составов

Измерения вязкости выполняли при 20°C с использованием капиллярного вискозиметра Rheosense m-VROC (Rheosense, Сан-Рамон, Калифорния). Образцы с различными концентрациями REGN1979 в диапазоне от 79,9 до 184,9 мг/мл готовили в рецептурном буфере, содержащем 10 мМ гистидина и 5% сахарозы (рН 5,8). Все образцы отфильтровывали с использованием 2 мкм центрифужных спин-фильтров перед измерением. Результаты измерений приведены ниже в табл. 42.

Таблица 42. Вязкость-концентрации белка

<b>Концентрация белка (мг/мл) в составе лекарственной субстанции (10 мМ гистидина, рН 5,8, 5% сахарозы)</b>	<b>Вязкость при 20°C без понизителя вязкости (сП)</b>
79,9	2,8
115,7	5,4
154,8	12,1
184,9	33,0

Было определено, что лекарственный препарат, содержащий определенную концентрацию REGN1979, L-гистидин (0,57 мг/мл), моногидрат моногидрохлорида L-гистидина (1,33 мг/мл), сахарозу (100 мг/мл), полисорбат 80 (1 мг/мл) и воду для инъекций (USP), имеет вязкость, показанную в табл. 43 ниже.

Таблица 43. Вязкость лекарственного препарата

	Концентрация REGN1979	Вязкость (сП)
2 мг лекарственного препарата	2 мг/мл	1,4
80 мг и 160 мг лекарственного препарата	20 мг/мл	1,7
200 мг лекарственного препарата	100 мг/мл	4,95

Низкая вязкость (например, менее 15 сП), наблюдаемая у составов, концентрация антитела в которых достигает 154,8 мг/мл, благоприятна для использования в предварительно заполненных шприцах или автоинъекторах.

Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Напротив, различные модификации изобретения помимо тех, что описаны в настоящем документе, будут очевидны специалистам в данной области техники после изучения приведенного выше описания. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильный жидкий фармацевтический состав, содержащий:

(а) биспецифичное антитело в концентрации  $2 \pm 0,2$  мг/мл или  $20 \pm 2$  мг/мл, где биспецифичное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит три определяющих комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3), содержащиеся в вариательной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариательной области легкой цепи (LCVR), и второй антигенсвязывающий домен содержит три CDR тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3), содержащиеся в вариательной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариательной области легкой цепи (LCVR), где A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, соответственно, SEQ ID NO: 7, 8 и 9, A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, соответственно, SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, соответственно, SEQ ID NO: 13, 14 и 15;

(b) буфер, содержащий гистидин в концентрации от 5 до 15 мМ;

(c) полисорбат в концентрации от 0,05 до 0,15% мас./об. и

(d) сахарозу в концентрации от 8% до 12% мас./об.;

где состав имеет pH  $5,8 \pm 0,3$ , и

где по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C по данным SE-СВЭЖХ.

2. Фармацевтический состав по п.1, где гистидиновый буфер содержит L-гистидин и моногидрат моногидрохлорида L-гистидина.

3. Фармацевтический состав по п.1 или 2, где полисорбат представляет собой полисорбат 80.

4. Фармацевтический состав по п.1, содержащий:

(a)  $2 \text{ мг/мл} \pm 0,2 \text{ мг/мл}$  антитела,

(b)  $10 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$  гистидинового буфера,

(c)  $0,1\% \pm 0,05\%$  мас./об. полисорбата и

(d)  $10\% \pm 1\%$  мас./об. сахарозы, при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

5. Фармацевтический состав по п.4, содержащий:

(a) 2 мг/мл антитела;

(b) 0,57 мг/мл гистидина и 1,3 мг/мл моногидрат моногидрохлорида L-гистидина;

(c) 1 мг/мл полисорбата 80 и

(d) 100 мг/мл сахарозы.

6. Фармацевтический состав по п.1, содержащий:

(a)  $20 \text{ мг/мл} \pm 2 \text{ мг/мл}$  антитела,

(b)  $10 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$  гистидинового буфера,

(c)  $0,1\% \pm 0,05\%$  мас./об. полисорбата и

(d)  $10\% \pm 1\%$  мас./об. сахарозы при pH  $5,8 \pm 0,3$ .

7. Фармацевтический состав по п.6, содержащий:

(a) 20 мг/мл антитела;

(b) 0,57 мг/мл гистидина и 1,3 мг/мл моногидрат моногидрохлорида L-гистидина;

(с) 1 мг/мл полисорбата 80 и

(d) 100 мг/мл сахарозы.

8. Фармацевтический состав по п.4, где по меньшей мере 98% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C по данным SE-СВЭЖХ.

9. Фармацевтический состав по п.6, где по меньшей мере 96% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C по данным SE-СВЭЖХ.

10. Фармацевтический состав по любому из пп.1-9, где антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, присоединенную, соответственно, к HCVR каждого из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена.

11. Фармацевтический состав по п.10, где константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

12. Фармацевтический состав по п.10, где константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG4.

13. Фармацевтический состав по п.10, где константная область тяжелой цепи, присоединенная к HCVR первого антигенсвязывающего домена, или константная область тяжелой цепи, присоединенная к HCVR второго антигенсвязывающего домена, но не обе, содержат замену H435R и замену Y436F (по нумерации EU) и где константные области тяжелой цепи принадлежат изотипу IgG1 или IgG4.

14. Фармацевтический состав по п.10, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

15. Фармацевтический состав по п.14, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

16. Фармацевтический состав по п.14, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

17. Фармацевтический состав по любому из пп.1-9, где антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую HCVR первого антигенсвязывающего домена, и вторую тяжелую цепь, содержащую HCVR второго антигенсвязывающего домена, где первая тяжелая цепь содержит остатки 1-452 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, а вторая тяжелая цепь содержит остатки 1-448 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

18. Фармацевтический состав по п.17, где антитело содержит две копии общей легкой цепи, содержащей, соответственно, LCVR первого и второго антигенсвязывающих доменов, где общая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

19. Фармацевтический состав, содержащий:

(а) 2 мг/мл  $\pm$  0,2 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

(b) 10 мМ  $\pm$  1 мМ гистидинового буфера, pH 5,8 $\pm$ 0,2,

(с) 0,1%  $\pm$  0,01% мас./об. полисорбата 80 и

(d) 10%  $\pm$  1% мас./об. сахарозы,

где состав имеет вязкость менее чем 2 сантипуаз (сП) при 20°C при измерении с использованием капиллярного вискозиметра и по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C по данным SE-СВЭЖХ.

20. Фармацевтический состав по п.19, содержащий:

(а) 2 мг/мл антитела;

(b) 0,57 мг/мл гистидина и 1,3 мг/мл моногидрат моногидрохлорида L-гистидина;

(с) 1 мг/мл полисорбата 80 и

(d) 100 мг/мл сахарозы.

21. Фармацевтический состав, содержащий:

(а) 20 мг/мл  $\pm$  2 мг/мл биспецифичного антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD20 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

- (b) 10 мМ ± 1 мМ гистидинового буфера, pH 5,8±0,2,
- (c) 0,1% ± 0,01% мас./об. полисорбата 80 и
- (d) 10% ± 1% мас./об. сахарозы,

где состав имеет вязкость менее чем 2 сантипуаз (сП) при 20°C при измерении с использованием капиллярного вискозиметра и по меньшей мере 95% антитела имеет нативную конформацию после 1 месяца хранения при 45°C по данным SE-СВЭЖХ.

22. Фармацевтический состав по п.21, содержащий:

- (a) 20 мг/мл антитела;
- (b) 0,57 мг/мл гистидина и 1,3 мг/мл моногидрат моногидрохлорида L-гистидина;
- (c) 1 мг/мл полисорбата 80 и
- (d) 100 мг/мл сахарозы.

23. Фармацевтический состав по любому из пп.19-22, где антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую HCVR первого антигенсвязывающего домена, вторую тяжелую цепь, содержащую HCVR второго антигенсвязывающего домена, и общую легкую цепь, содержащую LCVR первого и второго антигенсвязывающих доменов, где первая тяжелая цепь содержит остатки 1-452 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, вторая тяжелая цепь содержит остатки 1-448 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 и общая легкая последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

24. Фармацевтический состав по п.23, где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и общая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

