

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490877 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.07

(22) Дата подачи заявки
2022.10.06

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61M 5/28 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G16H 70/40 (2018.01)

(54) ОПИСАНИЕ СПОСОБА ПРИГОТОВЛЕНИЯ СОСТАВА ДЛЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО НАПОЛНЕНИЯ ШПРИЦОВ

(31) 2021-166336; 2022-042112

(32) 2021.10.08; 2022.03.17

(33) JP

(86) PCT/JP2022/037469

(87) WO 2023/058723 2023.04.13

(71) Заявитель:
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)

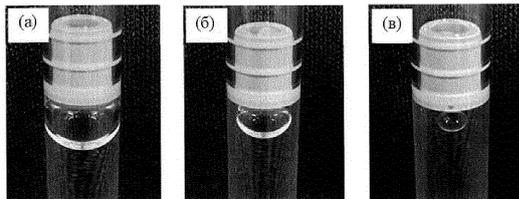
(72) Изобретатель:

Араи Кэнго, Хираяма Кадзунори,
Эгами Кинти, Фукуда Масакадзу (JP)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описано снижение образования визуально обнаруживаемых частиц в составе для инъекций, в котором раствором, содержащим белок, наполняют контейнер. Настоящее изобретение обеспечивает способ определения белка, имеющего высокий риск образования частиц.



A1

202490877

202490877

A1

ОПИСАНИЕ СПОСОБА ПРИГОТОВЛЕНИЯ СОСТАВА ДЛЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО НАПОЛНЕНИЯ ШПРИЦОВ

5

Область техники

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, который содержит в растворе белок в качестве активного ингредиента и которым наполнен в контейнер.

10

Предшествующий уровень техники

В последние годы разработаны и применяются на практике различные составы антител, причем многие составы антител используют для внутривенных инъекций. Между тем, из-за потребностей реальной медицинской практики растет необходимость в разработке составов с антителами, предназначенных для самостоятельного введения пациентами путем подкожной инъекции. В частности, существует большая потребность в разработке жидкого состава, которым может быть предварительно наполнен шприц, что облегчает его применение.

15

20

При разработке состава для подкожной инъекции, содержащего антитело, важно, чтобы концентрация антитела во вводимой жидкости была высокой, поскольку количество антитела для введения большое (около 80-200 мг), а количество жидкости для подкожной инъекции обычно ограничено.

25

В последние годы в реальной медицинской практике используют предварительно наполненный шприц с лекарственным средством, предназначенным для самостоятельного введения. Такой шприц состоит из цилиндрического корпуса инъекционного шприца, наполненного лекарственным средством, иглы, прикрепленной к ведущему концу корпуса инъекционного шприца, съемного прикрепленного колпачка шприца, закрывающего иглу, и поршня, который вставлен в корпус инъекционного шприца и выполнен с возможностью скольжения в осевом направлении корпуса инъекционного шприца.

30

При использовании предварительно наполненного шприца колпачок шприца снимают, иглу вводят в место введения, а затем поршень перемещают

вперед с помощью штока поршня для выделения и введения раствора лекарственного средства. Обычно для обеспечения скольжения поршня на внутреннюю стенку предварительно наполненного шприца и поршня наносят смазку из силиконового масла или другого аналогичного средства.

5 Образование частиц в водном растворе является нежелательным для состава, содержащего антитело. Формируемые частицы представляют собой агрегаты крупнее мультимеров, таких как димеры и тримеры, и известные частицы включают невидимые частицы (НВЧ), то есть микрочастицы с размером частиц от 1,5 мкм до менее 50 мкм, которые обычно трудно увидеть глазами, а
10 также видимые частицы (ВЧ, размером более 100 мкм), которые визуальнo обнаруживаются при стандартной освещенности (около 2000–3000 лк). Степень визуального обнаружения видимых частиц в фармацевтическом составе сильно варьируется в зависимости от эксперта, и при стандартной освещенности, предписанной японской фармакопеей (около 2000–3000 лк), установлено, что
15 чувствительность обнаружения частиц размером 100 мкм составляет около 40%, чувствительность обнаружения частиц размером 150 мкм составляет около 70%, а чувствительность обнаружения частиц размером 200 мкм составляет почти 100% (не патентная литература 1). Фактически, частицы меньшего размера, составляющим минимум около 40 мкм, можно обнаружить визуальнo путем
20 увеличения освещенности при наблюдении за фармацевтическим составом или путем увеличения периода наблюдения. В настоящем описании такие частицы с размером в диапазоне от 40 мкм до 100 мкм называют визуальнo обнаруживаемыми частицами только при высокой освещенности. Кроме того, частицы с размером 40 мкм или более являются частицами, визуальнo
25 обнаруживаемыми при высокой освещенности, и их называют визуальнo обнаруживаемыми частицами.

Обычно антитела адсорбируются и агрегируют на границах раздела сред, например, на границе воздух-жидкость и границе твердое тело-жидкость. Наличие таких границ раздела сред может способствовать образованию
30 визуальнo фиксируемых частиц, описанных выше. Сообщают, что приложение механического давления к шприцу, наполненному раствором антитела, приводит к заметному увеличению количества микрочастиц, что можно объяснить наличием границы раздела (не патентная литература 2). Граница раздела сред

воздух-жидкость образуется в растворе антител, наполняющем шприц, из-за присутствия пузырьков воздуха, а граница раздела сред твердое тело-жидкость образуется, когда раствор контактирует с поршнем и цилиндром шприца. Кроме того, когда силикон наносят на поршень и цилиндр предварительно наполненного шприца, раствор антител контактирует с силиконом на поверхности твердой фазы и образует новую границу твердого тела и жидкости. Кроме того, сообщают, что белки, которые адсорбируются и агрегируют на границе твердого тела и жидкости, отделяются от раствора при движении воздуха в предварительно наполненном шприце и появляются в виде видимых частиц (не патентная литература 3).

Пример способа снижения напряжения, приложенного к различным поверхностям, включает уменьшение количества пузырьков воздуха в предварительно наполненном шприце. Количество воздуха, перемещающегося внутри предварительно наполненного шприца, можно уменьшить путем уменьшения количества пузырьков воздуха, в результате чего предполагают, что адсорбцию на границе сред воздух-жидкость или граница сред твердое тело-жидкость и десорбцию агрегатов можно подавить.

Сообщалось, что количество невидимых и видимых частиц в растворе, не содержащем поверхностно-активного вещества, можно уменьшить в предварительно наполненном шприце, содержащем специфическое антитело, за счет уменьшения количества пузырьков воздуха в растворе, но в обоих литературных источниках описывают конкретные молекулярно-теоретические результаты и результаты оценки, полученные в крайне нестабильных условиях (патентная литература 1 и 2).

Аминокислотные остатки, являющиеся составными элементами белка, имеют разные физические свойства из-за различия функциональных групп, содержащихся в боковых цепях. Характеристики физических свойств боковых цепей можно грубо разделить на два типа в зависимости от того, включена ли в боковую цепь функциональная группа, имеющая заряд, и насколько боковая цепь гидрофобна.

Специалисты в данной области знают, что модель трехмерной структуры белка может быть построена на компьютере с помощью программного

обеспечения для вычислительной химии путем ввода информации об аминокислотной последовательности.

Что касается такого физического свойства аминокислотных остатков как заряд, частичный заряд на атомном уровне можно рассчитать с помощью параметра, называемого молекулярным силовым полем. В программном обеспечении для вычислительной химии Молекулярной Операционной Среде (МОС); Chemical Computing Group Inc. (CCG)) используют молекулярное силовое поле, обозначенное как Amber 10: ЕНТ, и частичный заряд каждого атома, составляющего аминокислоту белка, распределяют по версия ff10 силового поля Amber (не патентная литература 4), которая постоянно совершенствуется с момента публикации в 1995 году. Как показатель гидрофобности аминокислотного остатка индекс гидрофобности коррелирует с экспериментально измеряемым коэффициентом распределения октанол/вода logP, предложенным в 1990-е годы, и индексом, разработанным Sipren с соавт. используют в МОС (не патентная литература 5).

В 1990-х годах предложен метод обнаружения на заданном уровне и выше локализации (пэтчей) гидрофобного аминокислотного остатка с зарядом в трехмерной структуре белка на основе показателей заряда и гидрофобности отдельных аминокислотных остатков (не патентная литература 6), а в 2018 году сообщалось, что их можно обнаружить с помощью описанного выше программного обеспечения для вычислительной химии МОС в виде заряженного пэтча и гидрофобного пэтча, соответственно, и они до некоторой степени коррелируют с экспериментальными данными, полученные при открытии лекарств (не патентная литература 7).

Кроме того, в качестве примера применения программного обеспечения МОС для вычислительной химии для разработки лекарственных средств сообщалось, что площадь гидрофобного пэтча антитела, рассчитанная с помощью МОС, в некоторой степени коррелирует со скоростью образования видимых частиц (не патентная литература 8).

Цитируемая литература

Патентная литература

[Патентная литература 1] открытый японский патент No. 2015-042638

[Патентная литература 2] международная публикация No. WO 2017/184880

Не патентная литература

[Не патентная литература 1] James A. Melchore, *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(1): 215-221

5 [Не патентная литература 2] Torisu с соавт., *J. Pharm. Sci.* 2017, 106, 2966-2978

[Не патентная литература 3] Gerhardt с соавт., *J. Pharm. Sci.* 2014, 103, 1601-1612

[Не патентная литература 4] Cornell с соавт., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179-5197

10 [Не патентная литература 5] Wildman с соавт., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1999, 39, 868-873

[Не патентная литература 6] Jones с соавт., *J. Mol. Biol.* 1997, 272, 133-143

[Не патентная литература 7] Jetha с соавт., *MABS* 2018, 10, 6, 890-900

15 [Не патентная литература 8] Grapentin с соавт., *J. Pharm. Sci.* 109 (2020) 2393-2404

Краткое описание изобретения

Техническая проблема

Ничего не было известно о корреляции с другим параметром, отличным от гидрофобного пэтча, основанного на результатах вычислений модели
20 трехмерной структуры, и риском образования визуально обнаруживаемых частиц в растворе, содержащемся в предварительно наполненном шприце. Кроме того, есть потребность в более совершенном способе ингибирования образования частиц.

В настоящем изобретении было обнаружено, что в биологическом
25 лекарственном средстве, в молекуле которого было произведено большое количество модификаций для увеличения отклонения гидрофобности и заряда, трудно полностью ингибировать образование визуально обнаруживаемых частиц даже после добавления соответствующего количества поверхностно-активного вещества.

Решение проблемы

30 Итак, авторы настоящего изобретения обнаружили следующее: у антитела, числовое значение которого рассчитано на основе площади гидрофобного пэтча и площади заряженного пэтча, равного или превышающего заданное значение,

образование визуально обнаруживаемых частиц в предварительно наполненном в шприц составе, ингибирование которого невозможно в достаточной степени даже после добавления поверхностно-активного вещества, можно значительно ингибировать за счет уменьшения объема воздуха. Настоящее описание охватывает следующую сущность изобретения.

[1-1] Способ определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок, белка с высоким риском образования в растворе частиц, причем указанный способ включает: построение модели трехмерной структуры белка на основе его аминокислотной последовательности путем моделирования гомологии или моделирования антител; определение на поверхности полученной модели участка, где гидрофобные остатки накапливаются кластере, и участка, где остатки с зарядом накапливаются в кластере в виде гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, соответственно, и вычисление площади пэтчей; расчет суммы площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных по площади (X ((ангстрем)²)), и общей площади заряженных пятен (Y ((ангстрем)²)); подтверждение того, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 1700 или более, представляет собой белок, имеющий высокий риск образования частиц в растворе, причем размер частиц, составляет 40 мкм или более.

[1-2] Способ по пункту [1-1], в котором заряд положительный.

[1-3] Способ по пункту [1-1], в котором заряд отрицательный.

[1-4] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-3], в которых белок имеет значение « $X + Y \times 1,5$ » 2000 или более определяют как белок с высоким риском образования в растворе частиц.

[1-5] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-4], в которых Amber 10: ЕНТ используют в качестве молекулярного силового поля при моделировании гомологии или моделировании антител.

[1-6] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-5], в которых размер частиц превышает 100 мкм.

[1-7] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-6], в которых раствор представляет собой водный раствор.

[1-8] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-7], в которых белок является моноклональным антителом, слитым белком, гормоном, цитокином, ферментом или вакциной.

5 [1-9] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-8], в которых белок является моноклональным антителом.

[1-10] Способ по пункту [1-9], в котором моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

[1-11] Способ по пункту [1-9], в котором моноклональное антитело является любым из числа IgG1, IgG2 и IgG4.

10 [1-12] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-11], в которых построение модели трехмерной структуры осуществляют путем моделирования антитела.

[1-13] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-12], в которых моделирование гомологии или моделирование антител осуществляют с помощью программного обеспечения Молекулярной Операционной Среды (МОС).

15 [2-1] Способ определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок, белка с высоким риском образования в растворе частиц, причем указанный способ включает: построение модели трехмерной структурной белка на основе его аминокислотной последовательности путем моделирования гомологии или моделирования антитела; определение на поверхности полученной модели участка, соответствующего кластеру остатков с зарядом, как заряженного пэтчя, и расчет общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и определение того, что белок, имеющий значение X 6000 или более является белком с высоким риском образования частиц в растворе, причем размер частиц, составляет 40 мкм или более.

[2-2] Способ по пункту [2-1], в котором заряд положительный.

[2-3] Способ по пункту [2-1], в котором заряд отрицательный.

25 [2-4] Способ по любому из пунктов от [2-1] до [2-3], в которых белок имеющий значение Y , равное 700 или более, определяют как белок с высоким риском образования в растворе частиц.

[2-5] Способ по любому из пунктов от [2-1] до [2-4], в которых Amber 10: ЕНТ используют в качестве молекулярного силового поля при моделировании гомологии или моделировании антител.

5 [2-6] Способ по любому из пунктов от [2-1] до [2-5], в которых размер частиц превышает 100 мкм.

[2-7] Способ по любому из пунктов от [1-1] до [1-6], в котором где раствор представляет собой водный раствор.

10 [2-8] Способ по любому из пунктов от [2-1] до [2-7], в котором белок является моноклональным антителом, слитым белком, гормоном, цитокином, ферментом или вакциной.

[2-9] Способ по любому из пунктов от [2-1] до [2-8], в которых белок является моноклональным антителом.

[2-10] Способ по пункту [2-9], в котором моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

15 [2-11] Способ по пункту [2-9], в котором моноклональное антитело является любым из числа IgG1, IgG2 и IgG4.

[2-12] Способ по любому из пунктов от [2-1] до [2-11], в котором построение модели трехмерной структуры осуществляют путем моделирования антитела.

20 [2-13] Способ по любому из пунктов от [2-1] до [2-12], в котором моделирование гомологии или моделирование антител осуществляют с помощью программного обеспечения Молекулярной Операционной Среды (МОС).

25 [3-1] Способ снижения образования частиц в составе для инъекций, в котором раствор, содержащий белок в качестве активного ингредиента, помещен в контейнер, причем указанный способ включает: уменьшение объема пузырьков воздуха в контейнер до 40 мкл или менее, причем контейнер представляет собой шприц или картридж, а белок представляет собой белок, определенный способом согласно любому из пунктов от [1-1] до [1-13] и от [2-1] до [2-13], как обладающий высоким риском образования частиц в растворе.

30 [3-2] Способ по пункту [3-1], включающий уменьшение объема пузырьков воздуха в контейнере до 10 мкл или менее.

[3-3] Способ по пункту [3-1] или [3-2], в котором контейнер является шприцом.

[3-4] Способ по пункту [3-3], в котором шприц закупоривают методом установки вакуумной пробки или методом установки механической пробки.

[3-5] Способ по любому из пунктов от [3-1] до [3-4], в котором размер частиц равен 100 мкм или более.

5 [3-6] Способ по любому из пунктов от [3-1] до [3-5], в котором раствор представляет собой водный раствор.

[3-7] Способ по любому из пунктов от [3-1] до [3-6], в котором белок является моноклональным антителом, слитым белком, гормоном, цитокином, ферментом или вакциной.

10 [3-8] Способ по любому из пунктов от [3-1] до [3-7], в которых белок является моноклональным антителом.

[3-9] Способ по пункту [3-8], в котором моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

15 [3-10] Способ по пункту [3-8], в котором моноклональное антитело является любым из числа IgG1, IgG2 и IgG4.

[3-11] Способ по пункту [3-8], в котором моноклональное антитело является антителом, имеющим H-цепь последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4, а также L-цепь SEQ ID NO: 5, или антителом, имеющим H-цепь последовательности SEQ ID NO: 6 и L-цепь SEQ ID NO: 7.

20 [3-12] Способ по пункту [3-8], в котором моноклональное антитело является антителом, имеющим комбинацию H-цепи SEQ ID NO: 8 и L-цепи SEQ ID NO: 9, а также комбинацию H-цепи SEQ ID NO: 11 и L-цепи SEQ ID NO: 11 и L-цепи SEQ ID NO: : 10.

25 [4-1] Способ приготовления состава для инъекций, в котором присутствует раствор, содержащий белок в качестве активного ингредиента, которым наполняют контейнер таким образом, чтобы объем пузырьков воздуха составлял 40 мкл или менее в контейнере с полученным составом для инъекций, причем контейнер представляет собой шприц или картридж, а белок представляет собой белок, определенный способом согласно любому из пунктов от [1-1] до [1-13] и
30 от [2-1] до [2-13], как обладающий высоким риском образования частиц в растворе.

[4-2] Способ по пункту [4-1], включающий наполнение контейнера раствором таким образом, чтобы объем пузырьков воздуха в контейнере с полученным составом для инъекции составлял 10 мкл или менее.

5 [4-3] Способ по пункту [4-1] или [4-2], в которых контейнер является шприцом.

[4-4] Способ по пункту [4-3], в котором контейнер закупоривают методом установки вакуумной пробки или методом установки механической пробки при наполнении контейнера раствором.

10 [4-5] Способ по любому из пунктов от [4-1] до [4-4], в которых частицы имеют размер 100 мкм или более.

[4-6] Способ по любому из пунктов от [4-1] до [4-5], в которых раствор представляет собой водный раствор.

[4-7] Способ по любому из пунктов от [4-1] до [4-6], в которых белок является моноклональным антителом.

15 [4-8] Способ по пункту [4-7], в котором моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

[4-9] Способ по пункту [4-7], в котором моноклональное антитело является любым из числа IgG1, IgG2 и IgG4.

20 [4-10] Способ по пункту [4-7], в котором моноклональное антитело является антителом, имеющим Н-цепь последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4, а также L-цепь SEQ ID NO: 5, или антителом, имеющим Н-цепь SEQ ID NO: 6 и L-цепь SEQ ID NO: 7.

25 [4-11] Способ по пункту [4-7], причем моноклональное антитело представляет собой антитело, имеющее комбинацию Н-цепи SEQ ID NO: 8 и L-цепи SEQ ID NO: 9, а также комбинацию Н-цепи SEQ ID NO: 11 и L-цепи SEQ ID NO: 10.

30 [5-1] Состав для инъекций, в котором присутствует раствор, содержащий белок в качестве активного ингредиента, помещают в контейнер, причем белок представляет собой белок, определенный способом согласно любому из пунктов от [1-1] до [1-13] и от [2-1] до [2-13], как имеющий высокий риск образования частиц в растворе, а контейнер представляет собой шприц или картридж, и объем пузырьков воздуха в контейнере составляет 40 мкл или менее.

[5-2] Состав для инъекций по пункту [5-1], в котором объем пузырьков воздуха в контейнере составляет 10 мкл или менее.

[5-3] Состав для инъекций по пункту [5-1] или [5-2], в которых контейнером является шприц.

5 [5-4] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-3], в которых концентрация белка в растворе составляет 0,1 мг/мл или более.

[5-5] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-4], причем концентрация белка в растворе находится в диапазоне от 0,1 до 300 мг/мл.

10 [5-6] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] to [5-5], причем концентрация белка в растворе находится в диапазоне от 1 до 200 мг/мл.

[5-7] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-6], причем количество раствора, содержащегося в шприце емкостью 1 мл, находится в диапазоне от 0,1 до 1,2 мл, или количество раствора, содержащегося в шприце емкостью 2,25 мл, находится в диапазоне от 0,1 до 2,5 мл.

15 [5-8] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-7], причем количество раствора, содержащегося в шприце емкостью 1 мл, находится в диапазоне от 0,2 до 1,1 мл, или количество раствора, содержащегося в шприце емкостью 2,25 мл, находится в диапазоне от 0,3 до 2,3 мл.

20 [5-9] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-8], причем состав для инъекций, в котором в растворе присутствует белок в качестве активного ингредиента, помещают в контейнер, содержащий шприц или картридж с фармацевтическим составом, пробку, причем шприц или картридж изготовлены из стекла или их основой является смола циклоолефин.

25 [5-10] Состав для инъекций по пункту [5-9], где смола на основе циклоолефина представляет собой циклоолефиновый полимер (COP – cycloolefin polymer) или циклоолефиновый сополимер (COC – cycloolefin copolymer).

[5-11] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-10], причем размер частиц составляет 100 мкм или больше.

30 [5-12] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-11], причем раствор является водным раствором.

[5-13] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-12], причем белок является моноклональным антителом.

[5-14] Состав для инъекций по пункту [5-13], причем моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

5 [5-15] Состав для инъекций по пункту [5-13], причем моноклональное антитело является любым из числа IgG1, IgG2 и IgG4.

[5-16] Состав для инъекций по пункту [5-13], в котором моноклональное антитело является антителом, имеющим H-цепь последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4, а также L-цепь SEQ ID NO: 5, или антителом, имеющим H-цепь SEQ ID NO: 6 и L-цепь SEQ ID NO: 7.

10 [5-17] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-16], причем раствор содержит один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, включая сахар, сахароспирт, буфер, консервант, носитель, антиоксидант, хелатирующий агент, природный полимер, синтетический полимер, криозащитный агент, поверхностно-активное вещество, наполнитель и стабилизирующий агент или их комбинацию.

[5-18] Состав для инъекций по пункту [5-17], причем поверхностно-активным веществом является полисорбат, поллоксамер 188, лаурилсульфат натрия, полиол, поли(этиленгликоль), глицерин, пропиленгликоль или поли(виниловый спирт).

20 [5-19] Состав для инъекций по пунктам [5-17] или [5-18], в которых поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или поллоксамер 188.

[5-20] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-17] до [5-19], в которых концентрация поверхностно-активного вещества в растворе составляет 25 0,01 мг/мл или более.

[5-21] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-17] до [5-20], в которых концентрация поверхностно-активного вещества в растворе находится в диапазоне от 0,01 до 5 мг/мл.

30 [5-22] Состав для инъекций по пунктам от [5-17] до [5-21], в которых концентрация поверхностно-активного вещества в растворе находится в диапазоне от 0,25 до 0,75 мг/мл.

[5-23] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-22], причем pH раствора находится в диапазоне от 4,5 до 7,5.

[5-24] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-23], причем рН раствора находится в диапазоне от 5,0 до 7,0.

[5-25] Состав для инъекций по пунктам от [5-1] до [5-24], причем рН раствора находится в диапазоне от 5,5 до 6,5.

5 [5-26] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-25], причем среднее количество частиц в составе для инъекций после хранения в течение 3 месяцев в условиях понижаемого напряжения во время хранения при 25°C, снижается по сравнению с таковым в условиях, когда объем пузырьков воздуха в составе для инъекций составляет 120 мкл.

10 [5-27] Состав для инъекций по любому из пунктов от [5-1] до [5-25], причем среднее количество частиц в составе для инъекций, содержащем 0,01 мг/мл поверхностно-активного вещества, после хранения в течение 1 суток при 5°C снижается по сравнению с условиями, когда объем пузырьков воздуха в составе для инъекций составляет 120 мкл.

15 [5-28] Состав для инъекций по любому из пунктов [5-13], [5-14] или от [5-17] до [5-26], в которых моноклональное антитело представляет собой антитело, имеющее комбинацию Н-цепи SEQ ID NO: 8 и L-цепи SEQ ID NO: 9, а также комбинацию Н-цепи SEQ ID NO: 11 и L-цепи SEQ ID NO: 10.

20 [6-1] Система для определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок с высоким риском образования в растворе частиц, причем указанная система включает: средства для построения модели трехмерной структурной белка на основе его аминокислотной последовательности путем моделирования гомологии или моделирования антител; средства для определения на поверхности полученной модели участка, где гидрофобные остатки накапливаются кластере, и участка, где остатки с зарядом накапливаются в кластере в виде гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, соответственно, и вычисление площади пэтчей; средства для расчета суммы площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных ранжированных по площади участков (X ((ангстрем)²)) и общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и средства для подтверждения того, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 1700 или более, представляет собой белок, имеющий высокий риск образования частиц в растворе, причем размер частиц составляет 40 мкм или более.

25

30

[6-2] Система по пункту [6-1], причем заряд является положительным зарядом.

[6-3] Система по пункту [6-1], причем заряд является отрицательным зарядом.

5 [6-4] Система по любому из пунктов от [6-1] до [6-3], в которых белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 2000 или более, определяют как белок с высоким риском образования в растворе частиц.

10 [6-5] Система по любому из пунктов от [6-1] до [6-4], в которых Amber 10: ЕНТ используют в качестве молекулярного силового поля при моделировании гомологии или моделировании антитела.

[6-6] Система по любому из пунктов от [6-1] до [6-5], причем размер частиц более 100 мкм.

[6-7] Система по любому из пунктов от [6-1] до [6-6], в которых раствор является водным раствором.

15 [6-8] Система по любому из пунктов от [6-1] до [6-7], в которых белок является моноклональным антителом, слитым белком, гормоном, цитокином, ферментом или вакциной.

[6-9] Система по любому из пунктов от [6-1] до [6-8], причем белок является моноклональным антителом.

20 [6-10] Система по пункту [6-9], причем моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

[6-11] Система по пункту [6-9], причем моноклональное антитело является любым из числа IgG1, IgG2 и IgG4.

25 [6-12] Система по любому из пунктов от [6-1] до [6-11], в которых построение модели трехмерной структуры осуществляют путем моделирования антитела.

[6-13] Программа, позволяющая компьютеру управлять соответствующими средствами системы по любому из пунктов от [6-1] до [6-12].

[6-14] Носитель данных, на котором хранится программа по пункту [6-13].

30 [6-15] Устройство для определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок, имеющий высокий риск образования частиц в растворе, включающее установленную в нем программу по пункту [6-13].

[7-1] Система для определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе белок в качестве активного ингредиента, белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе, причем система включает: средства для построения трехмерной структурной модели белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антител; средства для определения участка на поверхности полученной модели, соответствующего кластеру остатков с зарядом, в виде заряженного пэтчя, и расчета общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и средство для определения того, что белок, имеющий значение Y 600 или более, является белком, имеющим высокий риск образования частиц в растворе, при этом частицы имеют размер 40 мкм или более.

[7-2] Система по пункту [7-1], причем заряд является положительным зарядом.

[7-3] Система по пункту [7-1], причем заряд является отрицательным зарядом.

[7-4] Система по любому из пунктов от [7-1] до [7-3], причем белок имеющий значение Y , равное 700 или более, определяют как белок с высоким риском образования в растворе частиц.

[7-5] Система по любому из пунктов от [7-1] до [7-4], причем Amber 10: ЕНТ используют в качестве молекулярного силового поля при моделировании гомологии или моделировании антител.

[7-6] Система по любому из пунктов от [7-1] до [7-5], причем размер частиц больше 100 мкм.

[7-7] Система по любому из пунктов от [7-1] до [7-6], причем раствор представляет собой водный раствор.

[7-8] Система по любому из пунктов от [7-1] до [7-7], причем белок является моноклональным антителом, слитым белком, гормоном, цитокином, ферментом или вакциной.

[7-9] Система по любому из пунктов от [7-1] to [7-8], причем белок является моноклональным антителом.

[7-10] Система по пункту [7-9], причем моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

[7-11] Система по пункту [7-9], причем моноклональное антитело является любым из числа IgG1, IgG2 и IgG4.

[7-12] Система по любому из пунктов от [7-1] до [7-11], причем построение модели трехмерной структуры осуществляют путем моделирования антитела.

5 [7-13] Программа, позволяющая компьютеру управлять соответствующими средствами системы по любому из пунктов от [7-1] до [7-12].

[7-14] Носитель данных, на котором хранится программа по пункту [7-13].

10 [7-15] Устройство для определения в фармацевтическом составе, содержащем белок в качестве активного ингредиента в растворе, белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе, содержащее установленную в нем программу по пункту [7-13].

Преимущество настоящего изобретения

В одном объекте настоящего изобретения можно определить белок, имеющий высокий риск образования визуально обнаруживаемых частиц в растворе состава, которым предварительно наполнен шприц. В другом объекте настоящего изобретения может быть предусмотрен состав для предварительного наполнения шприца, в котором максимально ингибируется образование визуально обнаруживаемых частиц.

Краткое описание фигур

20 Фигура 1. Фотографии шприцев, содержащих пузырьки воздуха в объеме 120 мкл (а), 40 мкл (б) и 10 мкл (в).

Фигура 2. Схематическая диаграмма картонной коробки, используемой в испытании на падение.

Фигура 3. Примерная схема конфигурации шприца.

25 Фигура 4. Гистограмма размеров визуально обнаруживаемых белковых частиц белка, идентифицированного в примере 3.

Фигура 5. Технологическая схема выполнения программы для устройства для определения белка с высоким риском образования частиц в растворе на основе гидрофобного пэтча и заряженного пэтча.

30 Фигура 6. Технологическая схема выполнения программы для устройства для определения белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе на основе заряженного пэтча.

Фигура 7. Принципиальная схема устройства для определения белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе.

Описание вариантов осуществления настоящего изобретения

(1) Определение риска образования визуально обнаруживаемых частиц

5 В настоящем изобретении визуально обнаруживаемой частицей называют такую частицу, которую можно обнаружить визуально при высокой освещенности и которая имеет размер 40 мкм или более. Среди них частицы, которые визуально обнаруживаются при стандартной освещенности, предписанной японской фармакопеей (около 2000-3000 лк), их называют «видимые частицы» или «нерастворимые видимые частицы». Обычно видимые частицы имеют размер более 100 мкм (не патентная литература 1). Частицы, размер которых меньше чем у видимых частиц, и которые невозможно увидеть глазами при стандартной освещенности, предписанной японской фармакопеей (около 2000–3000 лк), но которые можно обнаружить визуально путем увеличения освещенности или увеличения периода наблюдения, называют «частицами, визуально обнаруживаемыми только при повышенном освещении», их размер составляет от 40 до 100 мкм. Наличие видимых частиц можно подтвердить визуальным осмотром невооруженным глазом в течение 5 секунд или дольше при освещении в диапазоне стандартной освещенности (около 2000–20 3000 лк), медленно вращая или переворачивая контейнер перед черным или белым фоном. Наличие частиц, визуально обнаруживаемых только при высокой освещенности, можно подтвердить визуальным осмотром невооруженным глазом в течение 30 секунд или дольше при освещении при высокой освещенности (6000 люкс или выше), медленно вращая или переворачивая 25 контейнер на черном фоне. Наличие видимых частиц также можно подтвердить при осмотре при высокой освещенности. Частицы, за исключением тех, которые образуются из белковых молекул в растворе, не считаются «визуально обнаруживаемыми частицами» независимо от размера. Происходят ли визуально обнаруживаемые частицы из белковых молекул, можно подтвердить с помощью рамановской микроспектроскопии. Единственное содержимое, содержащееся в 30 растворе в виде белка, представляет собой активный фармацевтический ингредиент (API – active pharmaceutical ingredient), и из API образуются визуально обнаруживаемые частицы. Размер частиц и количество визуально

обнаруживаемых частиц можно определить с помощью метода подсчета частиц при затенении света, метода микроскопического подсчета частиц, метода анализа изображения частиц проточной цитометрией, визуального осмотра и инфракрасной микроспектроскопии (ИК-спектроскопии; ИК) или рамановского микроспектроскопического измерения, осуществляемых после выделения частиц, предпочтительно сочетают визуальный осмотр и инфракрасную микроспектроскопию или измерение с помощью рамановской микроспектроскопии.

В настоящем изобретении термин «высокий риск образования частиц» в растворе фармацевтического состава означает, что белковые молекулы в растворе легко агрегируют и образуют визуально обнаруживаемые частицы. Примеры белков с высоким риском образования частиц включают белки, которые могут образовывать визуально обнаруживаемые частицы даже после добавления соответствующего количества поверхностно-активного вещества.

В настоящем изобретении термин «пузырек воздуха» относится к пространству между жидкостью в контейнере и стенкой контейнера или к газу, присутствующему в жидкости. Пузырек воздуха имеет размеры, которые можно увидеть невооруженным глазом или при исследовании под световым микроскопом. Термин «в контейнере» включает, в случае предварительно наполненного шприца с иглой, все пространство, закрытое жестким защитным кожухом иглы и пробкой, а более конкретно включает пространство внутри иглы и внутри цилиндра. Когда контейнер находится в вертикальном положении, пузырь воздуха не распространяется по диаметру контейнера, и не вся жидкость, кроме части, касается нижней поверхности затвора контейнера (например, пробки). В одном варианте воздушный пузырь имеет сферическую форму. В другом варианте воздушный пузырь не имеет сферической формы. В таком варианте воздушный пузырь имеет форму яйца.

В одном объекте настоящего изобретения объем пузырьков воздуха может составлять 120 мкл или менее, 110 мкл или менее, 100 мкл или менее, 90 мкл или менее, 80 мкл или менее, 70 мкл или менее, 60 мкл или менее, 50 мкл или менее, 40 мкл или менее, 30 мкл или менее, 20 мкл или менее или 10 мкл или менее. В одном варианте осуществления настоящего изобретения объем пузырьков воздуха определяют как объем пузырьков воздуха, полученный, когда все

пузырьки в контейнере объединены. Объем пузырьков воздуха можно определить методом «фактического измерения объема пузырьков воздуха путем выдавливания из кончика иглы в порядке очереди газа и раствора в соответствующий контейнер с весами, например пипетку, уже содержащую раствор», «получения изображения и расчет объема пузырьков воздуха по площади частей пузырьков воздуха» или «расчетом объема пузырьков воздуха по высоте части пузырьков на основе уже известной информации о внутреннем диаметре цилиндра».

В одном объекте настоящего изобретения «моделирование гомологии» используют для определения белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе. «Моделирование гомологии» представляет собой метод оценки трехмерной структуры белка, имеющего специфическую последовательность, на основе сходства последовательности с одним или несколькими белками, имеющими известные трехмерные структуры. Обычно моделирование гомологии для конкретной аминокислотной последовательности включает в себя следующие этапы: 1) определение гомолога, имеющего известную структуру, в банке данных белков, 2) приведение целевой последовательности в соответствие с матричной структурой, 3) построение модели на основе такого согласования и 4) оценку и уточнение модели (Xiang, *Curr Protein Pept Sci.*, 2006, 7(3): 217-227).
Примеры программного обеспечения для оценки трехмерной структуры, оснащенного функцией моделирования гомологии, являются следующие источники, но ими перечень не ограничивается: Молекулярной Операционной Среды (MOC; Chemical Computing Group Inc. (CCG) (Канада), Web Antibody Modelling (WAM; <http://antibody.bath.ac.uk>), Rosetta (<https://www.rosettacommons.org/software>), Prime (Schrodinger), MODELLER (Eswar, с соавт., в кн.: «Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER, Current Protocols in Bioinformatics», John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30, 200), SEGMOD/ENCAD (Levitt M. *J Mol Biol* 1992; 226: 507-533), SWISS-MODEL (Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. C. *Nucleic Acids Research* 2003; 31: 3381-3385.), 3D-JIGSAW (Bates с соавт., *Proteins: Structure, Function and Genetics*, Suppl 2001; 5: 39-46), NEST (Xiang, *Curr Protein Pept Sci.* 2006, 7(3): 217-227), BUILDER (Koehl and Delarue, *Curr Opin Struct Biol* 1996, 6(2): 222-226). Предпочтительным программным обеспечением является MOC.

В одном объекте настоящего изобретения термин «моделирование антитела» относится к функции оценки трехмерной структуры и базе данных, специализирующейся на моноклональных антителах. При моделировании антител вся структура может быть собрана на основе структуры фрагмента.

5 Например, Fab-фрагмент антитела может быть добавлен к кристаллической структуре Fc-фрагмента, а Fab-фрагмент может быть сформирован как предполагаемая структура белка и добавлен к кристаллической структуре Fc-фрагмента. Например, функции, предусмотренные в МОС, можно использовать для моделирования антител.

10 В одном объекте настоящего изобретения термин «пэтч» относится к области поверхности кластера остатков, представляющих определенное физико-химическое свойство в трехмерной структуре белка или антитела. Примеры пэтчей включают гидрофобный пэтч и заряженный пэтч. Гидрофобное пятно – это участок поверхности той части, где гидрофобные остатки накапливаются в
15 кластере. Часть, где гидрофобные остатки накапливаются в кластере, также может включать остатки, отличные от гидрофобных остатков. Заряженный пэтч – это участок той части поверхности, где остатки с зарядом накапливаются в кластере. Часть, где в кластере накапливаются заряженные остатки, может включать и остатки без заряда.

20 В одном объекте настоящего изобретения количество признаков, касающихся площади пэтча белка, можно рассчитать с использованием функции свойств белка МОС. Что касается площади пэтча на поверхности конкретного белка, когда сумма площадей пяти наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных в соответствии с площадью гидрофобных пэтчей, установлена
25 как X ((ангстрем)²), а общая площадь заряженных пэтчей установлена как Y ((ангстрем)²), значение риска образования частиц белком можно определить на основе значения « $X + Y \times 1,5$ ». В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 1700 или выше, может быть определен как белок, имеющий высокий риск образования частиц. В
30 другом варианте осуществления настоящего изобретения белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 2000 или более, 2500 или более, 3000 или более, 3500 или более или 4000 или более, может быть определен как белок, имеющий высокий риск образования частиц.

В одном объекте настоящего изобретения величина проявления признака, касающаяся площади пэтча белка, может быть рассчитана с использованием функции свойств белка МОС, а в отношении площади пэтча конкретной поверхности белка риск образования частиц белком может быть рассчитан на основе общей площади заряженных пэтчей Y ((ангстрем)²). В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок, имеющий значение Y 600 или более, определяют как белок в высоком риском образования частиц. В другом варианте осуществления настоящего изобретения белок, имеющий значение Y 700 или более, 800 или более, 900 или более, 1000 или более, 1500 или более, 2000 или более, 2500 или более, 3000 или более или 4000 или более, определяют как белок, имеющий высокий риск образования частиц.

В настоящем изобретении термин «ранжирование по площади гидрофобных пэтчей» относится к списку гидрофобных пэтчей, идентифицированных на поверхности белка и расположенных в порядке площади, и каждый гидрофобный пэтч означает гидрофобный пэтч, состоящий из кластера гидрофобных остатков, независимо друг от друга присутствующих на поверхности белка и имеющих определенный размер. Сумма площадей пяти наиболее выраженных гидрофобных участков в рейтинге ((ангстрем)²) рассчитывают в настоящем изобретении как X . В настоящем изобретении сумма площадей пяти наиболее выраженных гидрофобных пэтчей относится к общей величине площадей пяти наиболее выраженных гидрофобных пэтчей. Однако если в молекуле имеется 4 или менее гидрофобных пэтчей, сумма относится к общей величине площадей всех реально присутствующих гидрофобных пэтчей.

Общая площадь заряженных участков означает сумму площадей ((ангстрем)²) всех положительно или отрицательно заряженных участков, присутствующих на поверхности белка.

В одном объекте настоящего изобретения термин «молекулярное силовое поле» представляет собой параметризацию в форме функции силы, приложенной к каждому атому, присутствующему в молекуле. В расчетах молекулярной механики и расчетах молекулярной динамики на основе молекулярного силового поля межатомная сила выражается как числовые значения потенциальной функции, определяемой в соответствии с типами атомов и способом связывания, с параметрами, представляющими межатомные связи (например, связь

расстояние и валентный угол) в качестве переменных. В расчетах молекулярной механики и расчетах молекулярной динамики на основе молекулярного силового поля межатомная сила выражается как числовые значения потенциальной функции, определяемой в соответствии с типами атомов и способом связи, с параметрами, представляющими межатомные связи (например, связь расстояние и валентный угол) в качестве переменных.

В одном объекте настоящего изобретения поле молекулярных сил, которое можно использовать, конкретно не ограничено, но может быть соответствующим образом выбрано в зависимости от цели, и примеры включают поле молекулярных сил Amber, поле молекулярных сил CHARMM и поле молекулярных сил OPLS. Примеры поля молекулярных сил Amber включают Amber 10/14: EHT, Amber ff99SB-ILDN и Amber 12SB. Пример молекулярного силового поля CHARMM включает CHARMM 36. Среди них Amber 10: EHT предпочтителен при использовании МОС.

15 (2) Уменьшение образования частиц

В одном объекте настоящего изобретения термин «уменьшение образования частиц» относится к регулированию объема пузырьков воздуха таким образом, чтобы не могли образовываться визуально обнаруживаемые частицы или уменьшалось количество образующихся частиц в растворе фармацевтического состава, в котором визуально обнаруживаемые частицы формируются при определенных условиях. Снижение образования визуально обнаруживаемых частиц можно подтвердить путем подсчета количества частиц до и после корректировки объема пузырьков воздуха. Размер и количество частиц можно определить с помощью метода подсчета частиц в условиях затенения, метода микроскопического подсчета частиц, метода анализа изображения частиц проточной цитометрией, визуального осмотра и инфракрасной микроспектроскопии (ИК-спектроскопии; ИК) или метода рамановского рассеяния после выделения частиц, и их предпочтительно измеряют путем сочетания визуального контроля и инфракрасной микроспектроскопии или рамановского рассеяния (комбинационного рассеяния) света.

30 (3) Фармацевтический состав

В одном объекте настоящего изобретения фармацевтический состав представляет собой раствор, содержащий белок в качестве активного ингредиента. Фармацевтический состав может быть составом для инъекций.

5 В одном объекте настоящего изобретения состав для инъекций представляет собой фармацевтический состав, который помещают в контейнер для инъекции для введения посредством инъекции и который содержит белок в качестве активного ингредиента в растворе.

10 В одном объекте настоящего изобретения термин «полученный состав для инъекций» относится к составу для инъекций, полученному в качестве конечного продукта после регулирования объема воздуха.

15 В одном объекте настоящего изобретения фармацевтический состав хранится без замораживания раствора в контейнере при температуре от -30°C до 25°C , предпочтительно от точки замерзания раствора до 25°C , более предпочтительно при температуре от 1°C до 10°C , более предпочтительно от 2°C до 8°C и еще более предпочтительно при 5°C . Хранение осуществляют в течение 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 25 часов, 26 часов, 27 часов, 28 часов, 29 часов, 30 часов, 31 час, 32 часы, 33 часа, 34 часа, 35 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 84 часа или 96 часов. Хранение осуществляют не менее 24 часов, не менее 2 суток, не менее 3 суток, не менее 4 суток, не менее 10 суток, не менее 20 суток, не менее 30 суток, не менее 40 суток, не менее 50 суток, не менее 60 суток, не менее 1 месяца, не менее 2 месяцев, не менее 3 месяцев, не менее 4 месяцев, не менее 5 месяцев, не менее 6 месяцев, не менее 7 месяцев, не менее 8 месяцев, не менее 9 месяцев, не менее 10 месяцев, не менее 11 месяцев или не менее 12 месяцев.

20

25

30 В одном объекте настоящего изобретения белок, используемый в жидком составе, включает, помимо прочего, антитело, слитый белок, фермент, гормон, цитокин и вакцину. Точнее, белок включает моноклональное антитело, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), эритропоэтин (ЭПО), интерферон, интерлейкины, такие как IL-1 или IL-6, тканевый активатор

плазминогена (ТРА), тромбopoэтин, урокиназа, сывороточный альбумин, фактор свертывания крови VIII, лептин, фактор стволовых клеток (SCF) и т.п.

В одном объекте настоящего изобретения белок, используемый в фармацевтическом составе, обладает по существу той же биологической активностью, что и биологически активный белок млекопитающего, в частности человека, и включает природные белки, а также белки, полученные с помощью генной инженерии. Белки, полученные с помощью генной инженерии, включают белки, имеющие ту же аминокислотную последовательность, что и нативный белок, или белки, полученные путем удаления, замены или добавления одной или нескольких аминокислотных последовательностей и обладающие описанной выше биологической активностью.

В одном объекте настоящего изобретения концентрация белка в растворе может составлять 0,1 мг/мл или более, в диапазоне от 0,1 до 300 мг/мл или в диапазоне от 1 до 200 мг/мл.

В одном объекте настоящего изобретения используемое антитело особенно не ограничено при условии, что оно связывается с желаемым антигеном, может быть поликлональным антителом или моноклональным антителом, предпочтительно является моноклональным антителом, поскольку гомогенное антитело, соответственно, может вырабатываться стабильно. В одном объекте настоящего изобретения используемое антитело может быть поликлональным антителом или моноклональным антителом или может быть мультиспецифическим антителом, имеющим в молекуле три или более антиген-распознающих сайтов.

В одном объекте настоящего изобретения используемое моноклональное антитело включает не только моноклональное антитело, полученное от животного, такого как человек, мышь, крыса, хомяк, кролик, овца, верблюд или обезьяна, но также полученное путем искусственной модификации рекомбинантное антитело, например, химерное антитело, гуманизированное антитело или биспецифическое антитело. Кроме того, также предусматривают рекомбинантное антитело, полученное искусственной модификацией константной области или других областей антитела для модификации физических свойств молекулы антитела (в частности, модификации

изоэлектрической точки (pI), модификации аффинности рецептора Fc и т.п.) в целях улучшения удерживания в крови и фармакокинетики.

В одном объекте настоящего изобретения не ограничена принадлежность используемого антитела к определенному классу иммуноглобулинов, и может представлять собой любой из классов IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также IgA, IgD, IgE и IgM, среди которых IgG является предпочтительным, и IgG1, IgG2 и IgG4 являются особенно предпочтительными.

Кроме того, в одном объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, не только включающее константную область и переменную область (полноразмерное антитело), но также фрагмент антитела, такой как Fv, Fab и F(ab)₂, и низкомолекулярное антитело, такое как биспецифическое антитело, одно- или двухассоциированный одноцепочечный Fv (scFv, sc(Fv)₂), имеющий переменную область антитела, связанную с линкером, таким как пептидный линкер, или димер scFv; полноразмерное антитело является предпочтительным.

В одном объекте настоящего изобретения предназначенное для применения антитело может быть получено известным способом. Гибридоме, используемую для получения моноклонального антитела, можно получить, в основном, с помощью известных методик следующим образом. В частности, желаемый антиген или клетку, экспрессирующую желаемый антиген, используемый в качестве сенсibiliзирующего антигена, иммунизируют обычным методом иммунизации, и полученную иммунную клетку сливают с известной родительской клеткой обычным методом слияния клеток, полученную в результате вакцину подвергают обычному методу скрининга для скрининга клетки, продуцирующей моноклональные антитела (гибридомы), и, таким образом, можно получить гибридоме. Получение гибридомы можно осуществлять, например, по методу Milstein с соавт. (Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46) или по другому подобному методу. Если иммуногенность антигена низкая, антиген может быть связан с макромолекулой, обладающей иммуногенностью, такой как альбумин, перед иммунизацией.

В другом варианте можно использовать рекомбинантное антитело, полученное путем клонирования гена антитела из гибридомы и включения этого гена в соответствующий вектор для введения в хозяина методами генной инженерии (см., например, Carl A.K. с соавт., THERAPEUTIC MONOCLONAL

ANTIBODIES, опубликовано в Великобритании издательством MACMILLAN PUBLISHERS LTD., 1990). В частности, кДНК варибельной области (V-области) антитела синтезируется на мРНК гибридомы обратной транскриптазой. ДНК, кодирующая V-область полученного таким образом целевого антитела, связывается с ДНК, кодирующей требуемую константную область антитела (C-область), и полученный результат включается в вектор экспрессии. В другом варианте ДНК, кодирующая V-область антитела, может быть включена в вектор экспрессии, содержащий ДНК C-области антитела. Полученный результат включают в вектор экспрессии для экспрессии под контролем области контроля экспрессии, такой как энхансер или промотор. Затем клетку-хозяина трансформируют полученным вектором экспрессии, и, таким образом, можно экспрессировать антитело.

В одном объекте настоящего изобретения можно использовать рекомбинантное антитело, полученное путем искусственной модификации с целью снижения гетероантигенности против человека, такое как химерное антитело или гуманизированное антитело. Такое модифицированное антитело можно получить известным способом. Химерное антитело представляет собой антитело, содержащее варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела млекопитающего, отличного от человека, например, мышиногo антитела, а также константные области тяжелой цепи и легкой цепи человеческого антитела, и может быть получено путем связывания ДНК, кодирующей варибельную область мышиногo антитела, с ДНК, кодирующей константную область человеческого антитела, включения полученного в вектор экспрессии и введения вектора в хозяина для получения антитела.

Гуманизированное антитело также обозначают как измененное человеческое антитело и его получают путем трансплантации области, определяющей комплементарность (CDR), антитела млекопитающего, отличного от человека, например, мышиногo антитела, в области, определяющей комплементарность человеческого антитела, а также известен общий метод генной инженерии для такого антитела. В частности, последовательность ДНК, предназначенная для связывания CDR мышиногo антитела с каркасной областью (FR) человеческого антитела, синтезируют методом ПЦР из нескольких олигонуклеотидов, полученных с перекрывающимися участками на концах.

Полученную таким образом ДНК связывают с ДНК, кодирующей константную область человеческого антитела, полученный результат впоследствии включают в вектор экспрессии, а полученный вектор вводят в хозяина для получения антитела (см. заявку на европейский патент № 239400 и WO 96/02576). В качестве FR человеческого антитела, подлежащего связыванию через CDR, выбирают тот, который имеет комплементарную область, определяющую комплементарность, образующую хороший сайт связывания антигена. При необходимости аминокислота в каркасной области, определяющей комплементарность, может быть заменена таким образом, чтобы заставить комплементарно определяющую область видоизмененного человеческого антитела сформировать подходящий антигенсвязывающий сайт (Sato, К. с соавт., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

В качестве методов замены аминокислоты в антителе для улучшения активности, физических свойств, фармакокинетики, безопасности и других свойств антитела известны, например, приведенные ниже методы, и в одном объекте настоящего изобретения предназначенное для применения антитело имеет замену (включая удаление и добавление) аминокислоты.

В качестве методов замены аминокислот в вариабельной области антитела IgG были разработаны и опубликованы не только методы гуманизации (Tsurushita N. с соавт., *Methods*, 2005, 36 (1): 69-83), но также и созревания аффинности путем замены аминокислот в области, определяющей комплементарность (CDR), для усиления связывающей активности (Rajpal A. с соавт., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (24): 8466-71), и улучшение физико-химической стабильности путем замены аминокислот в каркасе (FR) (Ewert S. с соавт. *Methods*, 2004, 34(2): 184-99. Обзор.). Известны методы для замены аминокислот в Fc-области антитела IgG для усиления антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплементзависимой клеточной цитотоксичности (CDC) (Kim S.J. с соавт. *Mol Cells*, 2005, 20(1): 17-29. Обзор.). Кроме того, известно о методах замены аминокислот в Fc не только за счет усиления такой эффекторной функции, но и за счет улучшения периода полувыведения антитела из крови (Hinton P.R. с соавт., *J Immunol.* 2006, 176(1): 346-56; Ghetie V. с соавт., *Nat Biotechnol*, 1997, 15(7): 637-40.). Кроме того,

известны различные способы замены аминокислот в константной области с целью улучшения физических свойств антитела (WO 09/41613).

Кроме того, известны способы получения антитела человека. Например, лимфоцит человека сенсibiliзируют желаемым антигеном или клеткой, экспрессирующей желаемый антиген *in vitro*, и сенсibiliзированный таким образом лимфоцит сливают с клеткой миеломы человека, например, U266, и, таким образом, может быть получено требуемое антитело человека, обладающее активностью связывания с антигеном (см. публикацию японского патента № 1-59878). Кроме того, если трансгенное животное, имеющее все репертуары генов антител человека, иммунизируют антигеном, можно получить требуемое антитело человека (см. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735). Кроме того, известен также способ получения антитела человека путем пэннинга с использованием библиотеки антител человека. Например, переменная область антитела человека экспрессируется в виде одноцепочечного антитела (scFv) на поверхности фага методом фагового дисплея, и, таким образом, можно выбрать связывание фага с антигеном. При анализе гена выбранного фага можно определить последовательность ДНК, кодирующую переменную область человеческого антитела, связывающегося с антигеном. Если последовательность ДНК scFv, связывающаяся с антигеном, будет установлена, можно получить подходящий вектор экспрессии, содержащий эту последовательность, для получения антитела человека. Эти способы уже известны и могут быть реализованы со ссылкой на WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 и WO 95/15388. В одном объекте настоящего изобретения используемое антитело включает такие антитела человека.

Когда антитело получают путем однократного выделения гена антитела и введения гена соответствующему хозяину, можно использовать подходящую комбинацию хозяина и вектора экспрессии. Когда в качестве хозяина используют эукариотическую клетку, можно использовать животную клетку, растительную клетку или грибную клетку. В качестве клеток животных используются (1) клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, миелома, ВНК (почка детеныша хомячка – baby hamster kidney), HeLa и Vero, (2) клетки амфибий, такие как ооцит *Xenopus*, и (3) клетки насекомых, такие как sf9, sf21 и

Тп5. В качестве растительной клетки известна клетка, полученная из растения рода *Nicotiana*, такая как клетка каллюсной культуры, полученная из *Nicotiana tabacum*. В качестве грибной клетки известны дрожжи, например, рода *Saccharomyces*, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, и нитчатые грибы, например, рода *Aspergillus*, такие как *Aspergillus niger*. Когда используют прокариотическую клетку, существует система продуцирования, использующая бактериальную клетку. В качестве бактериальной клетки известны *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Bacillus subtilis*. Когда ген-мишень антитела вводят в такую клетку путем трансформации и трансформированную таким образом клетку культивируют *in vitro*, можно получить антитело.

Кроме того, к антителу, используемому в фармацевтическом составе, также относится модифицированное антитело. Например, можно использовать антитела, связывающиеся с различными молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ), цитотоксическими лекарствами и т.п. (*Farmaco*. 1999, 54(8): 497-516, *Cancer J*. 2008, 14(3): 154-69). Такое модифицированное антитело можно получить путем химической модификации антитела. Такой метод уже применяется в данной области.

В одном объекте настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может представлять собой химерное антитело. Химерное антитело описано, например, в патенте US 4816567 и статье Morrison с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81: 6851-6855. Химерное антитело может содержать переменную область, не принадлежащую человеку (переменная область, полученная, например, от примата, не являющегося человеком, такого как обезьяна, или от мыши, крысы, хомяка, кролика или других животных), и константную область человека.

В одном объекте настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может представлять собой гуманизованное антитело. Типично, гуманизованное антитело гуманизируют для снижения иммуногенности у человека с сохранением специфичности и аффинности родительского антитела, не являющегося человеческим. Гуманизованное антитело обычно содержит одну или несколько переменных областей, и в нем присутствуют HVR, например, CDR, полученную из антитела, не принадлежащего человеку (или его части), и FR, полученный из последовательности антитела человека (или ее

части). Гуманизированное антитело может необязательно содержать по меньшей мере часть константной области человека. В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислотные остатки FR в гуманизированном антителе могут быть заменены соответствующими аминокислотными остатками антитела, не принадлежащего человеку (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для сохранения или улучшения специфичности и аффинности антитела.

Гуманизированное антитело и способ его получения рассматриваются, например, в Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 2008, 13: 1619-1633; Riechmann с соавт., *Nature* 1988, 332: 323-329; Queen с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1989, 86: 10029-10033; US 5821337, US 7527791, US 6982321, и US 7087409; Kashmiri с соавт., *Methods* 2005, 36: 25-34 (описание пересаживания области, определяющей специфичность (SDR – describing specificity determining region)); Padlan, *Mol. Immunol.* 1991, 28: 489-498 (описание «перекладки»); Dall'Acqua с соавт., *Methods* 2005, 36: 43-60 (описание «перетасовка FR»); и Osbourn с соавт., *Methods* 2005, 36: 61-68; Klimka с соавт., *Br. J. Cancer*, 2000, 83: 252-260 (описание подхода «направленная селекция» к перетасовке FR).

В одном объекте настоящего изобретения каркас антитела человека можно использовать при гуманизации, он может содержать, например, структуру, выбранную методом «наилучшего соответствия» (Sims с соавт., *J. Immunol.* 1993, 151: 2296), каркас, полученный из консенсусной последовательности антитела человека, принадлежащего определенной подгруппе варибельной области тяжелой цепи или легкой цепи (Carter с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 4285; Prest с соавт., *J. Immunol.*, 1993, 151: 2623), или каркасную область, полученную в результате скрининга библиотеки FR (Васа с соавт., *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 10678-10684; Rosok с соавт., *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 22611-22618).

В одном объекте настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может представлять собой антитело человека. Антитело человека можно получить различными методами. Антитело человека описано, например, van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001, 5: 368-374; Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 2008, 20: 450-459. Антитело человека можно получить путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному для получения полного антитела человека или полного антитела, содержащего

вариабельную область человека, в ответ на антиген. Такое животное репрезентативно содержит весь или часть локуса иммуноглобулина человека, и весь или часть локуса иммуноглобулина человека могут быть замещены локусом эндогенного иммуноглобулина, или он случайным образом включен вне хромосомы или внутри хромосомы животного. У такой трансгенной мыши эндогенный локус иммуноглобулина обычно инактивирован. Способ получения человеческого антитела от трансгенного животного рассмотрен в публикации Lonberg, *Nat. Biotech.* 2005, 23: 1117-1125. Кроме того, смотрите ссылку, например, US 6075181 и US 6150584, описывающий технологию XENOMOUSE(TM); US 5770429 описывающий технологию HUMAB(R); US 7041870 описывающий K-M MOUSE(R); US2007/0061900 описывающий технологию VELOCIMOUSE(R). Вариабельная область человека из полного антитела, полученного от такого животного, может быть дополнительно модифицирована, например, путем объединения с другой константной областью человека.

В другом объекте настоящего изобретения антитело человека можно получить методом, основанным на гибридоме. Клетка миеломы человека и линия клеток гетеромиеломы мышь-человек для продукции моноклонального антитела человека описаны в работах: например, Kozbor *J. Immunol.*, 1984, 133: 3001; Brodeur с соавт., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, с. 51-63 (изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); Boerner с соавт., *J. Immunol.*, 1991, 147: 86. Антитело человека, полученное с помощью технологии гибридомы В-клеток человека, описано в публикации Li с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103: 3557-3562. Другие примеры метода включают патент US 7189826 (описание производства моноклонального антитела человека IgM из линии клеток гибридомы) и публикацию Ni, *Xiandai Mianyixue*, 2006, 26 (4): 265-268 (описание гибридомы человека-человека). Технология гибридом человека (технология триомы) описана в публикации Vollmers, Brandlein, *Histology and Histopathology*, 2005, 20(3): 927-937, Vollmers, Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 2005, 27(3): 185-191.

В другом объекте настоящего изобретения антитело человека также можно получить путем выделения последовательности вариабельного домена клона Fv, выбранной из библиотек фагового дисплея, производных от человека. Такая

последовательность вариабельной области затем может быть объединена с требуемой константной областью человека. Методики выбора антитела человека из библиотек антител описаны ниже.

В одном из объектов настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может быть выделено путем скрининга комбинаторной библиотеки на наличие антитела, обладающего одной или несколькими требуемыми активностями. Например, способ создания библиотеки фагового дисплея, способ скрининга такой библиотеки на антитело, имеющее требуемую способность связывания, и т.п. известны в данной области техники. Такие методы рассмотрены в работе Hoogenboom с соавт. в кн.: «Methods in Molecular Biology» 178:1-37 (под ред. O'Brien с соавт., изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси, 2001) и описаны, например, McCafferty с соавт., *Nature* 348: 552-554; Clackson с соавт., *Nature* 1991, 352: 624-628; Marks с соавт., *J. Mol. Biol.* 1992, 222: 581-597; Marks и Bradbury, *Molecular Biology* 2003, 248: 161-175 (под ред. Lo, изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси); Sidhu с соавт., *J. Mol. Biol.* 2004, 338(2): 299-310; Lee с соавт., *J. Mol. Biol.* 2004, 340(5): 1073-1093; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101(34): 12467-12472; Lee с соавт., *J. Immunol. Methods* 2004, 284(1-2): 119-132.

В специфическом методе фагового дисплея, используемом в одном объекте настоящего изобретения, репертуары VH и VL могут быть отдельно клонированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайным образом рекомбинированы в фаговых библиотеках, а затем фаговые библиотеки могут быть подвергнуты скринингу на наличие антигенсвязывающих фагов, как описано в Winter с соавт., *Ann. Rev. Immunol.*, 1994, 12: 433-455. Фаг проявляет фрагмент антитела, такой как scFv или Fab. Библиотеки из иммунизированных источников могут обеспечить высокоаффинные антитела к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В другом варианте осуществления настоящего изобретения наивный репертуар может быть клонирован (например, от человека) для получения единого источника антител к широкому спектру чужеродных или аутоантигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths с соавт., *EMBO J*, 1993, 12: 725-734. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения наивные библиотеки также могут быть созданы синтетически путем клонирования не реаранжированных сегментов V-

гена из стволовых клеток и использования праймеров для ПЦР, содержащих случайную последовательность, кодирующую высоковариабельную область CDR3, и для выполнения реаранжировки *in vitro*, как описано в Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 1992, 227: 381-388. К примерам патентных публикаций, описывающих фаговые библиотеки антител человека, относятся: US 5750373, US 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 2009/0002360.

Антитело или фрагмент антитела, выделенные из библиотеки антител человека, рассматривают в настоящем изобретении здесь как антитело человека или фрагмент антитела человека.

В одном из объектов настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению представляет собой мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело). Мультиспецифическое антитело представляет собой антитело, обладающее специфичностью связывания по меньшей мере в двух разных сайтах (например, моноклональное антитело). В одном варианте осуществления настоящего изобретения одна из специфичностей связывания представляет собой специфичность к антигену, а другая представляет собой специфичность к другому антигену. В другом варианте осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело может связываться с двумя эпитопами разных антигенов. Биспецифическое антитело можно использовать для локализации цитотоксического агента в клетке, экспрессирующей антиген. Биспецифическое антитело можно получить в виде полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

Способ получения мультиспецифического антитела не является ограничительным, и примеры включают рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, имеющих разную специфичность (например, Milstein и Cuello, *Nature* 1983, 305: 537, WO93/08829, и Traunecker с соавт., *EMBO J.* 1991, 10: 3655), и технологию выступ-во-впадину (например, US 5731168). Мультиспецифическое антитело можно получить путем контроля эффектов электростатического управления для получения молекулы гетеродимера Fc (например, WO2009/089004 A1); перекрестное сшивание двух или более антител или фрагментов антител (например, US 4676980 и Brennan с соавт., *Science*, 1985, 229: 81); получение

антитела двойной специфичности с лейциновой молнией (например, Kostelny с соавт., *J. Immunol.*, 1992, 148 (5): 1547-1553); получение фрагмента биспецифического антитела методом «диатела» (например, Hollinger с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 6444-6448); используя димер scFv (например, Gruber с соавт., *J. Immunol.*, 1994, 152: 5368); или получение антитела тройной специфичности (например, Tutt с соавт., *J. Immunol.* 1991, 147: 60). В другом варианте мультиспецифическое антитело может представлять собой антитело, сконструированное таким образом, чтобы оно имело три или более функциональных антигенсвязывающих сайта, включая «антитело осьминог (например, US2006/0025576).

В одном из объектов настоящего изобретения антитело или фрагмент этого антитела по настоящему изобретению может представлять собой «Fab двойного действия» или «DAF», содержащий один антигенсвязывающий сайт, связывающийся с антигеном, и другой отличающийся от него антиген (например, US2008/0069820).

В одном из объектов настоящего изобретения вариант (мутант) аминокислотной последовательности антитела по настоящему изобретению можно получить путем введения соответствующей модификации в нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу антитела, или путем синтеза пептида. Такая модификация может быть осуществлена посредством одной или подходящей комбинации множества делеций, вставок и замен произвольной аминокислоты (остатка) в аминокислотной последовательности. Можно использовать произвольную комбинацию делеции, вставки и замены при условии, что конечная конструкция обладает желаемой характеристикой (например, свойством связывания антигена).

В одном из объектов настоящего изобретения когда предоставляется вариант антигена (мутант), возникающий в результате одной или множества аминокислотных замен, целевой сайт для введения замещающей мутации может содержать HVR и FR.

Примеры антитела, используемого в фармацевтическом составе, включают, помимо прочего, антитело против тканевого фактора, антитело против рецептора IL-6, антитело против IL-6, антитело против глипикана-3, анти-CD3 антитело, анти-CD20 антитело, анти-GPIIb/IIIa антитело, анти-TNF антитело, анти-CD25

антитело, анти-EGFR антитело, анти-Her2/neu антитело, анти-RSV антитело, анти-CD33 антитело, анти-CD52 антитело, анти-IgE антитело, анти-CD11a антитело, анти-VEGF антитело, анти-VLA4 антитело, анти-HM1.24 антитело, антитело против пептида, подобного гормону парашитовидной железы (анти-PTNRP антитело), антитело против ганглиозида GM3, антитело против агониста рецептора TPO, антитело, заменяющее фактор свертывания крови VIII, антитело против рецептора IL31, анти-HLA антитело, анти-AXL антитело, анти-CXCR4 антитело, анти-NR10 антитело и биспецифическое антитело к фактору IX и фактору X.

10 К примерам предпочтительно измененного гуманизированного антитела для использования в фармацевтическом составе относят гуманизированное антитело против рецептора интерлейкина 6 (IL-6) (тоцилизумаб, hPM-1 или MRA, см. WO92/19759), гуманизированное моноклональное антитело против антигена HM1.24 (см. WO98/14580), гуманизированное антитело против

15 пептида, связанного с гормоном парашитовидной железы (анти-PTNRP антитело) (см. WO98/13388), гуманизированное антитело против тканевого фактора (см. WO99/51743), гуманизированное антитело к глипикан-3 IgG1к (кодеритузумаб, GC33, см. WO2006/006693), гуманизированное анти-NR10 антитело (см. WO2009/072604) и биспецифическое гуманизированное антитело к фактору IX и

20 фактору X (ACE910, см. WO2012/067176).

В одном из объектов настоящего изобретения фармацевтический состав может быть приготовлен, если необходимо, путем смешивания с подходящим фармацевтически приемлемым носителем, средой и т.п. с жидким составом. Растворителем жидкого состава является вода или фармацевтически

25 приемлемый органический растворитель. Примеры такого органического растворителя включают пропиленгликоль (1,2-пропандиол), полиэтиленгликоль 300, полиэтиленгликоль 400, этанол, глицерин и уксусная кислота. Примеры подходящего фармацевтически приемлемого носителя и среды включают стерилизованную воду и физиологический раствор, стабилизирующий агент,

30 антиоксидант (такой как аскорбиновая кислота), буфер (такой как фосфорная кислота, лимонная кислота, гистидин или другая органическая кислота), антисептический агент, поверхностно-активное вещество (например, ПЭГ или Твин), хелатирующий агент (например, ЭДТА) и связывающий агент. В состав

могут быть включены другие полипептиды с низкой молекулярной массой, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулин, аминокислоты, такие как глицин, глютамин, аспарагин, глютаминовая кислота, аспарагиновая кислота, метионин, аргинин и лизин, сахара и углеводы, такие как полисахариды и моносахариды, также могут содержаться сахарные спирты, такие как маннит и сорбит. В случае получения раствора для инъекций примеры включают физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу или другое вспомогательное лекарственное средство, такое как D-сорбит, D-манноза, D-маннит или хлорид натрия, и его можно использовать вместе с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль или ПЭГ) и неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, полисорбат 20, полксамер 188 или HCO-50).

В одном из объектов настоящего изобретения буфер, используемый в жидком составе, готовят с использованием вещества, сохраняющего рН раствора. В одном объекте настоящего изобретения жидкий состав, содержащий высокую концентрацию антитела, имеет рН раствора предпочтительно от 4,5 до 7,5, более предпочтительно от 5,0 до 7,0 и еще более предпочтительно от 5,5 до 6,5. В одном объекте настоящего изобретения пригодный к использованию буфер может регулировать рН в этом диапазоне и является фармацевтически приемлемым. Такой буфер известен специалистам в области приготовления жидких составов, и могут быть применены такие неорганические соли, как фосфаты (натрия или калия) и бикарбонат натрия; органические соли, такие как цитраты (натрия или калия), ацетат натрия и сукцинат натрия; и кислоты, такие как фосфорная кислота, угольная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота, яблочная кислота и глюконовая кислота. В другом варианте можно использовать буферы Трис и буферы Гуда, такие как MES, MOPS и HEPES, гистидин (например, гидрохлорид гистидина), глицин и т.п.

Обычно концентрация буфера составляет от 1 до 500 мМ/л, предпочтительно от 5 до 100 мМ/л и более предпочтительно от 10 до 20 мМ/л. При использовании гистидинового буфера буфер предпочтительно содержит от 5 до 25 мМ/л гистидина и более предпочтительно содержит от 10 до 20 мМ/л гистидина.

В одном из объектов настоящего изобретения жидкий состав, содержащий высокую концентрацию антитела, предпочтительно стабилизируют добавлением стабилизирующего агента, подходящего для антитела, соответствующего активному ингредиенту. В одном объекте настоящего изобретения не наблюдают существенных изменений в «стабильном» жидком составе, содержащем высокую концентрацию антитела, в течение по меньшей мере 12 месяцев, предпочтительно в течение 2 лет и более предпочтительно в течение 3 лет при температуре охлаждения (от 2 до 8°C); или по меньшей мере в течение 3 месяцев, предпочтительно в течение 6 месяцев и более предпочтительно в течение 1 года при комнатной температуре (от 22 до 28°C). Например, общее количество димеров и разложившихся веществ после хранения при 5°C в течение 2 лет составляет 5,0% или менее, предпочтительно 2% или менее, и более предпочтительно 1,5% или менее, или общее количество димеров и разложившихся веществ после хранения при 25°C в течение 6 месяцев составляет 5,0% или менее, предпочтительно 2% или менее и более предпочтительно 1,5% или менее.

В одном из объектов настоящего изобретения репрезентативные примеры поверхностно-активных веществ включают неионогенные поверхностно-активные вещества, например, сложные эфиры сорбитана и жирных кислот, такие как монокаприлат сорбитана, монолаурат сорбитана и монопальмитат сорбитана; сложные эфиры глицерина и жирных кислот, такие как монокаприлат глицерина, мономирилат глицерина и моностеарат глицерина; сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, такие как декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат и декаглицерилмонолинолеат; сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, такие как монолаурат полиоксиэтиленсорбитана, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана, моностеарат полиоксиэтиленсорбитана, монопальмитат полиоксиэтиленсорбитана, триолеат полиоксиэтиленсорбитана и тристеарат полиоксиэтиленсорбитана; сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и жирных кислот, такие как тетрастеарат полиоксиэтиленсорбита и тетраолеат полиоксиэтиленсорбита; сложные эфиры полиоксиэтиленглицерина и жирных кислот, такие как моностеарат полиоксиэтиленглицерина; сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот, такие как дистеарат полиэтиленгликоля; алкиловые эфиры

полиоксиэтилена, такие как простой лауриловый эфир полиоксиэтилена; простые алкиловые эфиры полиоксиэтилена, полиоксипропилена, такие как простой эфир полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля, простой пропиловый эфир полиоксиэтилена-полиоксипропилена и простой цетиловый эфир полиоксиэтилена-полиоксипропилена; полиоксиэтиленалкилфениловые эфиры, такие как полиоксиэтиленнонилфениловый эфир; полиоксиэтилен-гидрированное касторовое масло, такое как полиоксиэтилен-гидрированное касторовое масло и полиоксиэтилен-гидрированное касторовое масло (полиоксиэтилен-гидрированное касторовое масло); производные полиоксиэтиленового пчелиного воска, такие как пчелиный воск с полиоксиэтиленсорбитом; производные полиоксиэтилен ланолина, такие как полиоксиэтилен ланолин; амиды полиоксиэтилен-жирных кислот, такие как амид полиоксиэтилен-стеариновой кислоты, которые имеют HLB от 6 до 18; анионные поверхностно-активные вещества, например, алкилсульфаты, имеющие алкильную группу, имеющую от 10 до 18 атомов углерода, такие как цетилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия и олеилсульфат натрия; сульфаты полиоксиэтиленалкилового эфира, такие как полиоксиэтиленлаурилсульфат натрия, имеющий среднее молярное количество добавленного этиленоксида от 2 до 4 и алкильную группу, имеющую от 10 до 18 атомов углерода; сложные эфиры алкилсульфоянтарной кислоты, имеющие алкильную группу, в которой от 8 до 18 атомов углерода, такие как сложный эфир лаурилсульфосукцината натрия; и природные поверхностно-активные вещества, например, лецитин и глицерофосфолипиды; сфингофосфолипиды, такие как сфингомиелин; и сложные эфиры жирных кислот сахарозы и жирных кислот, имеющих от 12 до 18 атомов углерода. В одном аспекте настоящего изобретения одно или несколько из этих поверхностно-активных веществ могут быть добавлены в состав в комбинации.

Предпочтительные поверхностно-активные вещества включают сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот и простые алкиловые эфиры полиоксиэтилена, полиоксипропилена, полисорбаты 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81, 85 и поверхностно-активные вещества Pluronic(R) являются особенно предпочтительными, а полисорбаты 20 и 80 и Pluronic(R) F-68 (полоксамер 188) являются наиболее предпочтительными.

В одном объекте настоящего изобретения количество поверхностно-активного вещества, добавляемого к препарату антитела, обычно составляет от 0,0001 до 10% (мг/мл), предпочтительно от 0,001 до 5% и более предпочтительно от 0,005 до 3%.

5 В состав по настоящему изобретению могут быть добавлены соответствующим образом криопротектор, суспендирующий агент, агент, способствующий растворению, агент, регулирующий тоничность, консервант, ингибитор адсорбции, разбавитель, эксципиент, регулятор рН, смягчающий агент, серосодержащий восстанавливающий агент, антиоксидант и т.п.

10 Примеры криопротектора включают сахара, такие как трегалоза, сахароза и сорбит.

Примеры агента, способствующего растворению, включают полиоксиэтиленированное гидрогенизированное касторовое масло, полисорбат 80, никотинамид, монолаурат полиоксиэтиленсорбитана, макрогол и этиловый эфир жирных кислот касторового масла.

15 Примеры агента, регулирующего тоничность, включают хлорид натрия, хлорид калия и хлорид кальция.

Примеры консерванта включают метилпарагидроксибензоат, этилпарагидроксибензоат, сорбиновую кислоту, фенол, крезол и хлоркрезол.

20 Примеры ингибитора адсорбции включают сывороточный альбумин человека, лецитин, декстран, сополимер этиленоксида/пропиленоксида, гидроксипропилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидрогенизированное полиоксиэтиленом касторовое масло и полиэтиленгликоль.

25 Примеры серосодержащего восстановителя включают агенты, содержащие сульфгидрильные группы, такие как N-ацетилцистеин, N-ацетилгомоцистеин, тиоктовая кислота, тиодигликоль, тиоэтанолламин, тиоглицерин, тиосорбит, тиогликолевая кислота и их соли, тиосульфат натрия, глутатион и тиоалкановые кислоты, имеющие от 1 до 7 атомов углерода.

30 Примеры антиоксиданта включают эриторбиновую кислоту, дибутилгидрокситолуол, бутилгидроксианизол, α -токоферол, ацетат токоферола, L-аскорбиновую кислоту и ее соли, пальмитат L-аскорбиновой кислоты, стеарат L-аскорбиновой кислоты, гидросульфит натрия, сульфит натрия, триамилгаллат,

пропилгаллат и хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетраацетат динатрия (ЭДТА), пирофосфат натрия и метафосфат натрия.

В одном объекте настоящего изобретения фармацевтический состав используют для лечения аутоиммунного заболевания, иммунного заболевания, 5 инфекционного заболевания, воспалительного заболевания, заболевания нервной системы, а также опухолевого заболевания и новообразования, включая рак. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтический препарат применяют для лечения застойной сердечной недостаточности (ЗСН), тяжелой аритмии, вызванной ишемией, гиперхолестеринемии, васкулита, 10 розацеа, акне, экземы, миокардита и других состояний сердечной мышцы, болезни Кавасаки, системной красной волчанки, диабета, спондилеза, синовиальных фибробластов и стромы костного мозга; потери костной массы; болезни Педжета, гигантоклеточной опухоли кости; рака молочной железы; дисфункциональной потери костной массы; недостаточности питания, 15 заболевания пародонта, болезни Гоше, гистиоцитоза клеток Лангерганса, повреждения спинного мозга, острого гнойного артрита, остеомалации, синдрома Кушинга, моностотической фиброзной дисплазии, полиоссальной фиброзной дисплазии, реконструкции пародонтальной мембраны и перелома; саркоидоза; меланомы, рака простаты, рака поджелудочной железы, 20 остеолитического рака кости, рака молочной железы, рака легких, рака желудка, рака почки и рака прямой кишки; костных метастаз, боли в костях, гуморальной гиперкальциемии злокачественных новообразований, анкилозирующего спондилита и других спондилоартрозов; отторжения трансплантата, вирусной инфекции, гематологического новообразования и такого новообразования, как 25 лимфома Ходжкина; неходжкинских лимфом (лимфомы Беркитта, малой лимфоцитарной лимфомы/хронического лимфолейкоза, грибовидного микоза, лимфомы мантийных клеток, фолликулярной лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза и лимфоплазмоцитарного лейкоза), опухоли клеток-предшественников 30 лимфоцитов, включая острый В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфому и острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфому, тимому, периферического Т-клеточного лейкоза, Т-клеточного лейкоза/Т-клеточной лимфомы взрослых, а также опухоли зрелых Т-клеток и природных НК-клеток, включая лейкоз

крупных гранулярных лимфоцитов, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, острый миелогенный лейкоз (ОМЛ) с созреванием, ОМЛ без дифференцировки, острых миелоцитарных лейкозов, включая острый промиелоцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза и острого моноцитарного лейкоза,

5 миелодиспластических синдромов и новообразования костного мозга, таких как хронические миелопролиферативные заболевания, включая хронический миелоцитарный лейкоз, опухоли центральной нервной системы, например, опухолей головного мозга (глиомы, нейробластомы, астроцитомы, медуллобластомы, эпендимомы и ретинобластомы), солидных опухолей (рака

10 носоглотки, базальноклеточного рака, рака поджелудочной железы, холангиокарциномы, саркомы Капоши, рака яичка, рака матки, рака влагалища или рака шейки матки, рака яичников, первичного рака печени или рака эндометрия, а также опухолей сосудистой системы (ангиосаркомы и гемангиоперицитомы), остеопороза, гепатита, ВИЧ, СПИД, спондилоартрита,

15 ревматоидного артрита, воспалительных заболеваний кишечника ((IBD ВЗК), сепсиса и септического шока, болезни Крона, псориаза, склеродермии, реакции трансплантата против хозяина (РТПХ), отторжения аллогенного островкового трансплантата, множественной миеломы (ММ), миелодиспластического синдрома (МДС) и гематологических злокачественных новообразований, таких

20 как острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), воспаления, связанного с опухолью, периферических повреждений нервов или демиелинизирующего заболевания. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтический препарат применяют для лечения вульгарного псориаза, панкреатита, язвенного колита, неходжкинской лимфомы, рака молочной железы, колоректального рака,

25 мезотелиомы, саркомы мягких тканей, ювенильного идиопатического артрита, дегенерации желтого пятна, респираторно-синцитиального вируса, болезни Крона, ревматоидного артрита, псориазического артрита, болезни Кастлемана, анкилозирующего спондилита, остеопороза, вызванной лечением потери костной массы, метастазы в кости, множественная миелома, болезнь Альцгеймера,

30 глаукомы, болезни Шегрена, болезни Стилла, рассеянного склероза, гипериммуноглобулинемии, анемии, мезангиального пролиферативного нефрита и астмы.

В одном объекте настоящего изобретения антиген, по отношению к которому антитело обладает свойством специфического связывания, может представлять собой трансмембранную молекулу (такую как рецептор) или лиганд, такой как фактор роста. Репрезентативные примеры антигена включают такую молекулу, как ренин; гормоны роста, включая гормон роста человека и гормон роста крупного рогатого скота; фактор, высвобождающий гормон роста; гормон парашитовидной железы; тиреотропный гормон; липопротеин; α -1 антитрипсин; А-цепь инсулина; В-цепь инсулина; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания крови, такие как фактор VIII, фактор IX, тканевой фактор (TF) и фактор фон Виллебранда; антикоагулянтные факторы, такие как С-белок; предсердный натрийуретический фактор; легочный сурфактант; активаторы плазминогена, такие как урокиназа и активатор плазминогена в моче или тканях человека (t-PA); бомбезин; тромбин; фактор роста гемопоэтических клеток; фактор некроза опухоли- α и - β ; энкефалиназа; RANTES (регулируется при активации обычно экспрессируемых и секретируемых Т-клеток); воспалительный белок макрофагов человека (MIP-1- α); сывороточный альбумин, такой как сывороточный альбумин человека; вещество, ингибирующее мюллерин; А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; пептид, родственный гормону, высвобождающему гонадотропин мыши; микробные белки, такие как β -лактамазы; ДНКаза; IgE; цитотоксические антигены, связанные с Т-лимфоцитами (CTLA – cytotoxic T-lymphocyte related antigens), такие как CTLA-4; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); рецепторы гормонов или факторов роста; белок А или D; ревматоидный фактор; нейротрофический фактор, такой как нейротрофический фактор костного происхождения (BDNF – bone-derived neurotrophic factor) или нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6), а также рост нервов такой фактор, как NGF- β ; фактор роста тромбоцитов (PDGF – platelet-derived growth factor); факторы роста фибробластов, такие как aFGF и bFGF; эпидермальный фактор роста (EGF – epidermal growth factor); трансформирующие факторы роста (TGF – transforming growth factors), такие как TGF- α и TGF- β , включая TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 и TGF- β 5; факторы некроза опухоли (TNF), такие как TNF- α и TNF- β ; инсулиноподобный фактор

роста-I и -II (IGF-I и IGF-II); дез(1-3)-1GF-I (IGF-I мозга) и белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста; белки CD, такие как CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 и CD40; эритропоэтин; белок костного морфогенеза; антитоксин; костный морфогенетический белок (BMP - bone morphogenetic protein);

5 интерфероны, такие как интерферон- α , - β , and - γ ; колониестимулирующие факторы (CSF – colony stimulating factors), такие как M-CSF, GM-CSF и G-CSF; интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 и IL-10; супероксиддисмутаза; рецептор Т-клеток; периферический мембранный белок; фактор ускорения распада; вирусные антигены, такие как часть оболочки

10 СПИДа; транспортный белок; самонаводящийся рецептор; адресин; регуляторные белки; интегрины, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; опухолевые антигены, такие как рецепторы HER2, HER3 и HER4; и фрагмент любого из описанных выше полипептидов.

В одном объекте настоящего изобретения примеры молекулярной мишени

15 антитела по настоящему изобретению включают белки CD, такие как CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 и CD40; представителей семейства рецепторов ErbB, такие как рецептор EGF и рецепторы HER2, HER3 или HER4; поверхностные антигены В-клеток, такие как CD20 и BR3; представителей надсемейства рецепторов некроза опухоли, включая DR5; антиген стволовых

20 клеток простаты (PSCA – prostate stem cell antigen); молекулы клеточной адгезии, такие как LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и интегрины $\alpha v/\beta 3$, включая любой из интегринов $\alpha 4/\beta 7$ и его α или β субъединицы (такие как анти-CD11a, анти-CD18 или анти-CD11b антитела); факторы роста, такие как VEGF и его рецепторы; тканевые факторы (ТФ); факторы некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factors), такие как TNF- α или TNF- β , и α -интерферон (α -IFN);

25 интерлейкины, такие как IL-8; IgE; антигены группы крови; рецептор flk2/flk3; рецептор ожирения (OB – obesity); рецептор mp1; CTLA-4; и С-белок.

(4) Контейнер

В одном объекте настоящего изобретения примеры контейнера для

30 наполнения фармацевтическим составом включают шприц и картридж.

В одном объекте настоящего изобретения термин «предварительно наполненный шприц» означает шприц, используемый в качестве контейнера и наполненный жидкой композицией. В одном варианте осуществления

настоящего изобретения предварительно наполненный шприц содержит фармацевтический состав для введения пациенту, которой наполнен шприц. В настоящем описании шприц может быть закрыт, например, пробкой. В одном варианте осуществления настоящего изобретения шприц наполнен композицией на разливочной установке. В одном варианте осуществления настоящего изобретения шприц стерилизуют перед наполнением его составом. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предварительно наполненный шприц может храниться перед введением составу пациенту в течение одного дня, или по меньшей мере 7 дней, или по меньшей мере 14 дней, или по меньшей мере 1 месяца, или по меньшей мере 6 месяцев, или по меньшей мере 1 год, или по меньшей мере 2 года. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предварительно наполненный шприц подвергают воздействию условий хранения и/или транспортировки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предварительно наполненный шприц подвергают механическому напряжению. Примеры механического напряжения включают, помимо прочего, напряжение падения, вибрационное напряжение и напряжение вращения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предварительно наполненный шприц подвергают напряжению при падении один, два, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз, одиннадцать раз, двенадцать раз, тринадцать раз, четырнадцать раз, пятнадцать раз, шестнадцать раз, семнадцать раз, восемнадцать раз, девятнадцать раз, двадцать раз, двадцать один раз, двадцать два раза, двадцать три раза, двадцать четыре раза, двадцать пять раз, двадцать пять раз или более, тридцать раз и более, или сорок раз или более. Напряжение, приложенное к предварительно наполненному шприцу во время падения, варьируют не только в зависимости от количества падений, но также от высоты падения, направления падения и т.п. Высота падения составляет, помимо прочего, 38,1 см, как описано в Американском обществе по испытаниям и материалам (ASTM) D4169. Кроме того, в целях приложения эквивалентного напряжения падения с высокой воспроизводимостью предварительно наполненный шприц может быть соответствующим образом упакован так, чтобы не изменять направление предварительно наполненного шприца во время падения. Пример упаковки

включает в себя, помимо прочего, «размещение лотков и укладку лотков стопкой» и «упаковку сложенных лотков в картонную коробку, имеющую поверхности, пронумерованные, как показано на фиг. 2, с иглой предварительно наполненного шприца, обращенной к поверхности 2». Предпочтительно, что касается высоты и направления падения, предварительно наполненный шприц роняют с высоты 38,1 см поверхностью, обращенной вниз, в падении, измененной в порядке: поверхность 1, поверхность 2, поверхность 3 и поверхность 4. Если это падение определено как одну серию падений, выполняются две серии падений для однократного приложения напряжения падения.

Как показано на фиг. 3, предварительно наполненный шприц включает шприц для введения лекарственного средства. Кроме того, предварительно наполненный шприц имеет пробку, которую можно вставлять в шприц. Предварительно наполненный шприц дополнительно включает в себя иглу, присоединяемую к шприцу. Предварительно наполненный шприц имеет колпачок для иглы. Лекарственное средство представляет собой жидкое лекарственное средство и представляет собой, например, белковый состав.

Шприц представляет собой емкость цилиндрической формы, имеющей переднюю концевую часть и базовую концевую часть. Кроме того, шприц является по существу цилиндрическим.

Емкость представляет собой элемент для содержания в нем лекарственного средства. Емкость согласно варианту осуществления настоящего изобретения включает в себя, помимо передней концевой части и базовой концевой части, цилиндрическую часть, соединяющую переднюю концевую часть и базовую концевую часть (см. фиг. 3). Кроме того, цилиндр имеет краевую часть, проходящую наружу (направление радиально наружу цилиндрической части) от всей внешней окружности другого конца в осевом направлении цилиндрической части.

Емкость сформирована, например, из материала, который является прозрачным и может выдерживать внутреннее давление, прикладываемое при введении лекарственного средства. В частности, материал цилиндра представляет собой смолу, содержащую циклический олефин, такой как норборнен, в повторяющемся звене. Более конкретно, примеры материала

цилиндра включают прозрачные смолы, такие как СОР (циклоолефиновый полимер), который представляет собой гомополимер циклического олефина, и СОС (циклоолефиновый сополимер), который представляет собой сополимер циклического олефина и этилена или тому подобное. Емкость может быть
5 изготовлена из ПП (полипропилена) или стекла.

На внутреннюю поверхность емкости (например, внутреннюю поверхность цилиндрической части) можно нанести силиконовое масло в качестве смазки для уменьшения сопротивления скольжению поршня по внутренней поверхности
емкости.

10 В одном объекте настоящего изобретения силиконовое масло представляет собой полидиметилсилоксан. Некоторыми примерами, не ограничивающими рамки охвата настоящего изобретения, являются медицинская жидкость Dow
Corning(R) 360, включая, помимо прочего, медицинскую жидкость Dow Corning
(R) 360 с вязкостью 350 сантистокс, медицинскую жидкость Dow Corning (R) 360
15 с вязкостью 1000 сантистокс, медицинскую жидкость Dow Corning (R) 360 с
вязкостью 12 500 сантистокс и медицинскую жидкость Dow Corning (R) MDX4-
4159.

В одном объекте настоящего изобретения размер (стандарт) объема шприца
специально не ограничивают. В частности, в одном объекте настоящего
20 изобретения полезный эффект заметен в случае шприца небольшого размера,
имеющего объем от 0,5 мл до 5,0 мл, предпочтительно 1 мл. Объем раствора,
содержащегося в стандартном шприце емкостью 1 мл, находится в диапазоне от
0,1 до 1,2 мл и предпочтительно в диапазоне от 0,2 до 1,1 мл. Объем раствора,
содержащегося в стандартном шприце емкостью 2,5 мл, находится в диапазоне
25 от 0,1 до 2,5 мл и предпочтительно в диапазоне от 0,3 до 2,3 мл. Когда
фармацевтический состав содержит водный раствор, объем водного раствора,
содержащегося в стандартном шприце емкостью 1 мл, находится в диапазоне от
0,1 до 1,2 мл и предпочтительно в диапазоне от 0,2 до 1,1 мл. Объем водного
раствора, содержащегося в стандартном шприце емкостью 2,5 мл, находится в
30 диапазоне от 0,1 до 2,5 мл и предпочтительно в диапазоне от 0,3 до 2,3 мл

В одном объекте настоящего изобретения размер (стандарт) объема
картриджа особо не ограничивается. В частности, объем может составлять,

помимо прочего, от 0,5 мл до 20,0 мл, например, 1,0 мл, 1,5 мл, 1,8 мл, 2,0 мл, 2,2 мл, 3,0 мл, 5,0 мл, 10,0 мл, 15,0 мл или 20,0 мл. мл.

В одном объекте настоящего изобретения используемый картридж может представлять собой стандартный картридж для инъекций, изготовленный из пластика или стекла. Размеры и допуски стеклянного инъекционного картриджа определены в международном стандарте ISO 13926-1. Пробки и уплотнения (колпачки и диски) описаны в международном стандарте ISO 13926-2 и 3. Размеры и допуски готового к наполнению шприца или предварительно наполненного шприца определены в международном стандарте ISO 11040-4. В одном варианте осуществления настоящего изобретения используемый картридж может представлять собой картридж для инъекций, изготовленный из пластика или стекла, который соответствует одному или нескольким из рассмотренных выше международных стандартов. В другом объекте настоящего изобретения используемый картридж может представлять собой картридж для инъекций, изготовленный из пластика или стекла, который не соответствует международным стандартам, таким как ISO.

(5) Система

В одном объекте настоящего изобретения предложена система для определения в фармацевтическом составе, содержащем белок в качестве активного ингредиента в растворе, белок, имеющий высокий риск образования частиц в растворе. Эта система включает средства для построения модели трехмерной структуры белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антител; средства для определения на поверхности полученной модели части, где гидрофобные остатки накапливаются в кластере, и части, где остатки с зарядом накапливаются в кластере в виде гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, соответственно, и расчета площадей пэтчей; средства для расчета суммы площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных по площади (X ((ангстрем)²)), и общей площади заряженных пятен (Y ((ангстрем)²)); и средство для определения того, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 1700 или более, является белком с высоким риском образования частиц в растворе.

В одном объекте настоящего изобретения система представляет собой систему для выполнения способа определения белка с высоким риском

образования частиц в растворе, и может осуществлять этот способ путем установки описываемой ниже программы в устройство для определения, такое как компьютер.

В одном объекте настоящего изобретения программа представляет собой программу, позволяющую компьютеру управлять соответствующими средствами в системе, и даже когда устройство для определения в фармацевтическом составе белка в качестве активного ингредиента в растворе, который имеет высокий риск образования частиц в растворе, представляет собой устройство общего назначения, программа представляет собой компьютерную программу, которая может сделать устройство общего назначения пригодным для использования в качестве устройства определения при установке в устройство общего назначения. В одном объекте настоящего изобретения компьютерную программу не всегда необходимо устанавливать в устройство для определения, но она может храниться, например, на предоставляемом носителе записи. В настоящем изобретении термин «носитель записи» относится к носителю, способному хранить программу, которая сама по себе не занимает места, и примеры включают гибкий диск, жесткий диск, CD-R, CD-RW, MO (магнитооптический диск), DVD-R, DVD-RW и флэш-память. Компьютерная программа также может быть передана от компьютера, на котором хранится компьютерная программа, к другому компьютеру или устройству по линии связи. В одном объекте настоящего изобретения компьютерная программа включает в себя такую компьютерную программу, хранящуюся в компьютере, и компьютерную программу в процессе передачи.

(Программа для устройства для определения белка с высоким риском образования частиц в растворе на основе гидрофобного пэтча и заряженного пэтча)

В одном объекте настоящего изобретения настоящее изобретение относится к программе, которую используют в устройстве для определения в фармацевтическом составе с белком в качестве активного ингредиента в растворе, белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе, на основе гидрофобного пэтча и заряженного пэтча или сохраняют на носителе записи, который будет использоваться.

Программа приводит к тому, что устройство или компьютер выполняют действия по построению трехмерной структурной модели белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антитела; действия для выявления на поверхности полученной модели части, где гидрофобные остатки накапливаются в кластере, и части, где остатки с зарядом накапливаются в кластере в виде гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, соответственно, и расчета площадей пэтчей; действия для расчета суммы площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных по площади (X ((ангстрем)²)), и общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и действия по определению того, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 1700 или более, является белком, имеющим высокий риск образования частиц в растворе.

В схеме структуры аппарата (10) для определения белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе, показанной на фиг.7, действия по построению модели выполнены частью модельной конструкции (12), основанной на аминокислотной последовательности, введенной через входную часть (11). Действия по определению гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, расчету площадей участков и расчету суммы площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных по площади (X ((ангстрем)²) и общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)) выполняет расчетная часть (13). Действия по определению того, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ », равное 1700 или выше, является белком с высоким риском образования частиц в растворе, осуществляется с помощью блока определения (14). Результат определения выводится из выходной части (15). Эти средства выполняются, например, с помощью центрального обрабатывающего устройства (CPU – Central Processing Unit), считывающего компьютерную программу, хранящуюся на жестком диске.

Если компьютерная программа не может занимать отдельное пространство, она может храниться на носителе записи информации для распространения. В настоящем изобретении термин «носитель информации» относится, например, к гибкому диску, жесткому диску, CD-ROM, CD-R, CD-RW, MO (магнитооптическому диску), MD, DVD-R, DVD-RW, флэш-память или карте IC. Носитель информации соединен с частью ввода/вывода данных на устройстве, и,

таким образом, компьютерная программа может быть установлена в памяти, такой как жесткий диск устройства. Кроме того, компьютерная программа может быть передана с другого компьютера, на котором хранится компьютерная программа, по линии связи на устройство, которое будет установлено в памяти, например на жестком диске.

Фиг. 5 иллюстрирует последовательность операций, осуществляемых устройством, когда выполняется компьютерная программа для устройства по определению белка с высоким риск образования частиц в растворе. CPU устройства считывает компьютерную программу для устройства, хранящуюся в памяти, такой как жесткий диск или подобное устройство, и создает трехмерную модель белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антитела. CPU устройства считывает компьютерную программу для устройства, хранящуюся в памяти, такой как жесткий диск или подобное устройство, и создает трехмерную модель белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антител. Затем CPU считывает компьютерную программу и определяет в построенной модели часть, где гидрофобные остатки накапливаются в кластере, и часть, где остатки с зарядом накапливаются в кластере в виде гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, соответственно, и вычисляет площади пэтчей, а также вычисляет сумму площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных по площади (X ((ангстрем)²)), и общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)). Затем CPU считывает компьютерную программу и определяет, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ », равное 1700 или выше, является белком, имеющим высокий риск образования частиц в растворе.

(Программа для устройства для определения белка с высоким риском образования частиц в растворе на основе заряженного пэтча)

В одном объекте настоящего изобретения в фармацевтическом составе, содержащем белок в качестве активного ингредиента в растворе, белок имеет высокий риск образования частиц в растворе на основе заряженного пэтча или хранится на записывающем носителе, который будет использоваться.

Программа обеспечивает выполнение действий по построению трехмерной структурной модели белка устройством или компьютером на основе

аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антител; действий по определению на поверхности полученной модели части, где остатки с зарядом накапливаются в кластере в виде заряженного пэтча, и расчету общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и действий по определению того, что белок, имеющий значение Y 600 или более, является белком, имеющим высокий риск образования частиц в растворе.

Действия по построению модели осуществляются в части построения модели. Действия по определению заряженного пэтча и расчета общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)) выполняются с помощью вычислительной части. Действия по определению того, что белок, имеющий значение Y 600 или более, является белком с высоким риском образования частиц в растворе, осуществляют в части определения. Эти действия выполняют, например, с помощью CPU, считывающего компьютерную программу, хранящуюся на жестком диске.

Если компьютерная программа не может занимать отдельное пространство, она может храниться на носителе записи информации для распространения. В настоящем изобретении термин «носитель информации» относится, например, к гибкому диску, жесткому диску, CD-ROM, CD-R, CD-RW, MO (магнитооптическому диску), MD, DVD-R, DVD-RW, флэш-память или карте IC. Носитель информации соединен с частью ввода/вывода данных на устройстве, и, таким образом, компьютерная программа может быть установлена в памяти, такой как жесткий диск устройства. Кроме того, компьютерная программа может быть передана с другого компьютера, на котором хранится компьютерная программа, по линии связи на устройство, которое будет установлено в памяти, например, на жестком диске.

Фиг. 6 иллюстрирует последовательность процесса, выполняемого устройством, когда выполняется компьютерная программа устройства для выявления белка, имеющего высокий риск образования частиц в растворе. CPU устройства считывает компьютерную программу для устройства, хранящуюся в памяти, такой как жесткий диск или подобное устройство, и создает трехмерную модель белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антитела. Затем CPU считывает

компьютерную программу, чтобы выявить в построенной модели ту часть, где остатки с зарядом накапливаются в кластере в виде заряженного пэтча, и вычисляет общую площадь заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)). Затем CPU определяет, что белок, имеющий значение Y 600 или выше, является белком с высоким риском образования частиц в растворе.

Примеры

Пример 1. Подсчет визуально фиксируемых частиц

В отношении каждого из шести антител mAb1 (Н-цепь/SEQ ID NO: 1, L-цепь/SEQ ID NO: 2; тоцилизумаб), mAb2 (Н-цепь/SEQ ID NO: 3 и 4: общая L-цепь: SEQ ID NO: 5), mAb3 (Н-цепь/SEQ ID NO: 6, L-цепь/SEQ ID NO: 7), mAb4 (гуманизированное биспецифическое антитело, имеющее альтернативную активность функции кофактора фактора свертывания крови VIII (FVIII)), mAb5 (гуманизированное антитело против латентного миостатинового захвата миостатина) и mAb6 (комбинация Н-цепи/SEQ ID NO: 8 и L-цепи/SEQ ID NO: 9, а также комбинация Н-цепи/SEQ ID NO: 11 и L-цепи/SEQ ID NO: 10; гуманизированное биспецифическое антитело против HLA-DQ2.5), раствор, содержащий антитело (каждого антитела от mAb1 до mAb6: 50 мг/мл, буфер: 20 мМ/L-гистидина, стабилизатор: 150 мМ/л аргинина и 162 мМ/л аспарагиновой кислоты, поверхностно активное вещество: 0,01 мг/мл полоксамера 188, pH 6,0) приготавливают, полученный продукт фильтруют через фильтр 0,22 мкм и вносят 1,0 мл полученного раствора в шприц COP с иглой 27G (стандарт 1 мл), стерилизованный радиацией (25 кГр), и полученный шприц закрывают пробкой. В отношении каждого из наполненных и закупоренных образцов оценку 1 визуально обнаруживаемых частиц выставляют сразу после закупоривания, а образец, в котором установлено, что он содержит визуально обнаруживаемые частицы в шприце, исключают. Было протестировано десять образцов каждого антитела и показано, что mAb6 крайне нестабильно по сравнению с другими антителами, причем визуально обнаруживаемые частицы очень часто образуются в них сразу после наполнения, поэтому было протестировано по три шприца каждого варианта. На основании стандартной кривой, полученной с помощью следующего метода измерения и установки объема воздуха, положение пробки каждого шприца регулируют так, чтобы подготовить образцы с объемом воздуха 120 мкл и 10 мкл. Для каждого образца объема воздуха была

проведена оценка 2 визуально обнаруживаемых частиц после хранения при температуре 5°C в течение 1 дня.

Оценка 1 визуально обнаруживаемых частиц

5 Внешнюю поверхность контейнера шприца каждого образца очищают, шприц медленно вращают или переворачивают непосредственно под источником белого света при яркости около 10 000 лк перед черным фоном и проводят визуальный осмотр в течение примерно 30 сек невооруженным глазом, чтобы проверить, присутствуют ли визуально обнаруживаемые частицы в растворе, которым наполнен шприц.

10 Способ измерения/установки объема воздуха

Шприцы COP с иглой 27G (стандарт 1 мл) для каждого образца, содержащие 1,0 мл раствора определенного антигена и закупоренные пробкой, держат иглой вверх, из кончика иглы вытесняют воздух, поднимая его до основания иглы, а положение пробки регулируют так, чтобы расстояние от 15 конца до пробки составляло 11 мм. Раствор и весь воздух, содержащийся в шприце, вводят в трубку с внутренним диаметром 0,5 мм. Объем воздуха в шприце рассчитывают путем измерения длины образовавшегося таким образом воздушного пространства в трубке. Это измерение повторяют 4 раза, и результаты показывают, что средний объем воздуха составляет 120 мкл, при 20 условии, что расстояние от конца до пробки составляет 11 мм. Далее готовят 3 образца, максимально выпустив воздух через кончик иглы шприца, и измеряют расстояние от конца до пробки. Среднее расстояние от конца до пробки составляет 15,1 мм. При этом фактический объем воздуха составляет 3 мкл. На основе результатов этих измерений построена стандартная кривая расстояния от 25 конца до пробки и объема воздуха, а объем воздуха установлен на основе расстояния от конца до пробки. Условия для установленного таким образом объема воздуха показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Настройка условий по объему воздуха

Расстояние от конца до пробки	Объем воздуха
11 мм	120 мкл
14,75 мм	10 мкл

Оценка 2 визуально обнаруживаемых частиц

Внешнюю поверхность контейнера шприцов с каждым образцом очищают, шприц медленно вращают или переворачивают непосредственно под источником белого света при яркости около 8000 лк перед черным фоном и проводят визуальный осмотр в течение примерно 30 сек невооруженным глазом, чтобы проверить, присутствуют ли визуально обнаруживаемые частицы в растворе, которым наполнен шприц. Что касается образца, в котором обнаружены визуально обнаруживаемые частицы, количество визуально обнаруживаемых частиц в шприце подсчитывают невооруженным глазом путем медленного вращения или переворачивания шприца в положении непосредственно под источником белого света при яркости около 8000 люкс на черном фоне.

Результаты оценки

Результаты оценки 2 визуально обнаруживаемых частиц в шприцах после хранения образцов при температуре 5°C в течение 1 дня показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Оценка результатов по визуально фиксируемым частицам после хранения при 5°C в течение 1 дня

Образец	Наполненное количество (мл)	Объем воздуха (мл)	Число визуально исследованных образцов	Число образцов, содержащих визуально фиксируемые частицы	Общее число визуально фиксируемых частиц	Среднее число визуально фиксируемых частиц на один шприц
mAb1-120	1	120	10	0	0	0
mAb1-10		10	10	0	0	0
mAb2-120	1	120	10	9	15	1,5
mAb2-10		10	10	6	10	1,0
mAb3-120	1	120	10	7	13	1,3
mAb3-10		10	10	3	3	0,3
mAb4-120	1	120	10	9	22	2,2
mAb4-10		10	10	4	5	0,5
mAb5-120	1	120	10	4	6	0,6
mAb5-10		10	10	2	2	0,2
mAb6-120	1	120	3	3	15	5,0
mAb6-10		10	3	3	6	2,0

Пример 2. Определение условий повышенного риска образования частиц

1. Построение трехмерной структурной модели антитела

В функции моделирования антител Молекулярной Операционной Среды (МОС), 2019.01 (Chemical Computing Group ULC), вводят аминокислотные последовательности шести антител (от mAb1 до mAb6) для сопоставления с отдельными матрицами для каждой из областей, определяющих комплементарность (CDR – complementary determining regions), и полученные результаты объединяют для создания трехмерной структурной модели каждого антитела в диапазоне полноразмерных IgG. В качестве условий расчета вариант «Цепи: VL и VH» используют для моноспецифического антитела, вариант «Цепи: биспецифический» используют для некоторых биспецифических антител, а вариант Ig иммуноглобулина используют для типа модели. Что касается всех антител, информацию о кристаллической структуре, оцененную как оптимальную с помощью функции моделирования антител, используют для матричных структур каркасной области и области, определяющей комплементарность. В качестве порога значения градиента (градиентного предела) энергетической минимизирующей конвергенции структуры используют 0,1 ккал/моль/(ангстрем)². В качестве других параметров используют значения по умолчанию. Что касается силового поля, в качестве стандарта МОС 2019.01 используют Amber 10: EHT.

Остатки, которые не содержатся в последовательностях антител mAb2 и mAb3, но автоматически комплементарны МОС, удаляют, а минимизацию энергии проводят на остатках вокруг удаленных. Остатки практически не делетируют для mAb1.

2. Расчет физических свойств трехмерных структурных моделей антител

Трехмерные структурные модели шести антител (от mAb1 до mAb6), построенных в 1., вводят для всестороннего расчета количества признаков каждого антитела по функции свойств белка МОС 2019.01. За исключением того, что целевой pH был изменен на 6, в качестве других параметров использовали значения по умолчанию. Таким образом, каждая выведенная сумма функций сохраняется в виде файла MDB.

Что касается каждого антитела, то четыре признака из подсчитанных признаков, а именно, сумма площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных

пэтчей среди всех гидрофобных пэтчей, ранжированных в соответствии с площадью (Patch_hyd_5), сумма площадей всех гидрофобных пэтчей (Patch_hyd), сумма площадей пяти наиболее заряженных пэтчей среди всех заряженных пэтчей, ранжированных по площади (Patch_ion_5), а также сумма площадей всех заряженных пэтчей (Patch_ion), извлекают из файла MDB для проверки корреляции с экспериментальными данными. На этом этапе также проводят корреляцию с экспериментальными данными для комбинации величин двух признаков. При исследовании корреляции коэффициент корреляции продукт-момент Пирсона и коэффициент ранговой корреляции Спирмена используют каждую величину признака в качестве переменной и используют среднее количество визуально обнаруживаемых частиц на шприц образца с объемом воздуха 120 мкл, как показано в табл. 2 примера 1, в качестве вариабельной. Во всех количественных оценках используют единицу площади (ангстрем)².

Во всех этих расчетах с использованием МОС, описанных выше, что касается поля молекулярных сил, используют Amber 10: ЕНТ, который является стандартом МОС 2019.01.

Значения Patch_hyd_5, Patch_hyd, Patch_ion_5 и Patch_ion шести антител (от mAb1 до mAb6) и объединенные значения (все с использованием единицы измерения (ангстрем)²), а также коэффициент корреляции продукт-момент Пирсона и коэффициент ранговой корреляции Спирмена среднее количество визуально обнаруживаемых частиц на шприц образца с объемом воздуха 120 мкл, приведенное в табл. 2 примера 1, показано в табл. 3.

В результате обнаружено, что существует высокая корреляция между значением Patch_ion и средним количеством визуально обнаруживаемых частиц на образец шприца, имеющего объем воздуха 120 мкл (коэффициент корреляции продукта-момента: 0,91). Кроме того, обнаружено, что сумма «Patch_hyd_5» и «(Patch_ion*1,5)» имеет наибольшую корреляцию со средним количеством визуально обнаруживаемых частиц на образец шприца, имеющего объем воздуха 120 мкл (коэффициент корреляции продукт-момент): 0,92).

Таблица 3. Расчетные величины МОЕ 2019.01 (единица: (ангстрем)²) шести антител (от mAb1 по mAb6) и коэффициенты корреляции со средним числом

визуально обнаруживаемых частиц в шприцах с образцом, имеющим объем воздуха 120 мкл

Образец	Patch_hyd_5	Patch_hyd	Patch_ion_5	Patch_ion	Patch_hyd_5 +(Patch_ion*1,5)
mAb6	690	2310	500	4040	6750
mAb4	720	2720	550	2660	4710
mAb2	710	2560	550	2420	4340
mAb3	860	2400	300	620	1790
mAb5	710	2190	260	720	1790
mAb1	730	2720	220	580	1600
Коэффициент корреляции продукт-момент	<0,80	<0,80	<0,80	0,91	0,92
Коэффициент ранговой корреляции	<0,80	<0,80	<0,80	0,94	0,99

5 Взаимосвязь между средним количеством визуально обнаруживаемых частиц на шприц с образцом с объемом воздуха 120 мкл, показанным в табл. 2 примера 1, и значением «Patch_hyd_5 + (Patch_ion*1,5)» представлена в табл. 4 ниже. Путем сравнения количества визуально детектируемых частиц в образцах с объемами воздуха 120 мкл и 10 мкл определяют степень снижения среднего количества визуально детектируемых частиц (степень снижения визуально
10 детектируемых частиц).

Таблица 4. Взаимосвязь между средним количеством визуально фиксируемых частиц на один шприц и «Patch_hyd_5+(Patch_ion*1,5)»

Образец	Среднее количество визуально фиксируемых частиц на один шприц		Степень снижения визуально фиксируемых частиц (%)	Patch_hyd_5 +(Patch_ion*1,5)
	Объем воздуха 120 мкл	Объем воздуха 10 мкл		
mAb6	5,0	2,0	60	6750
mAb4	2,2	0,5	77	4710
mAb2	1,5	1,0	33	4340
mAb3	1,3	0,3	77	1790
mAb5	0,6	0,2	67	1790
mAb1	0	0	-	1600

Пример 3. Тест для подтверждения образования визуально фиксируемых частиц mAb2

Раствор, содержащий mAb2 (mAb2: 150 мг/мл, буфер: 20 мМ/л гистидина, стабилизатор: 150 мМ/л аргинина и около 162 мМ/л аспарагиновой кислоты, поверхностно-активное вещество: 0,5 мг/мл полоксамера 188, рН 6,0) фильтруют через фильтр 0,22 мкм, затем 1,0 мл полученного раствора вводят в шприц СОР с иглой 27G (стандарт 1 мл), простерилизованный радиацией (25 кГр), и полученный шприц закрывают пробкой. Что касается наполненного и закупоренного образца, оценку 1 визуально обнаруживаемых частиц проводят сразу после закупоривания, а образец, в котором было установлено, что он содержит визуально обнаруживаемые частицы в шприце, исключают. На основе стандартной кривой, созданной в примере 1, положение пробки каждого шприца регулируют таким образом, чтобы оно соответствовало целевому объему воздуха, показанному в табл. 5. Каждый образец каждого объема воздуха хранят при температуре 5°C в течение примерно 7 месяцев, затем место хранения заменяют на хранение при 25°C, и хранят при температуре 25°C в течение 6 недель. Во время хранения при температуре 25°C трижды применяют описанное ниже механическое воздействие, а оценку 2 визуально обнаруживаемых частиц проводят по истечении 6 недель. В образце, в котором обнаружено присутствие визуально детектируемых частиц, визуально детектируемые частицы идентифицируют путем измерения спектра комбинационного рассеяния с использованием рамановского микроскопа (DXR2xi) для подтверждения того, что частицы происходят от mAb2.

Оценка 1 визуально обнаруживаемых частиц

Проверяли, присутствуют или нет визуально обнаруживаемые частицы в растворе, которым наполнен шприц, таким же образом, как и в оценке 1 визуально обнаруживаемых частиц примера 1, за исключением того, что яркость в положении непосредственно под источником белого света составляет около 8000 лк.

Таблица 5. Настройка условий по объему воздуха

Расстояние от края до пробки	Объем воздуха
11 мм	120 мкл
12 мм	90 мкл
12,7 мм	69 мкл

Расстояние от края до пробки	Объем воздуха
13,5 мм	46 мкл
14,3 мм	23 мкл
15,1 мм	3 мкл

Механическое напряжение

Что касается ASTM D4169, следующие испытания на падение и испытание на вибрацию объединяют в следующем порядке: испытание на падение, испытание на вибрацию и испытание на падение при приложении нагрузки.

Испытание на падение

Предварительно наполненный шприц помещают в лоток и в общей сложности три лотка ставят друг на друга. Лотки уложены в следующем порядке: пустой лоток, лоток для образцов и пустой лоток. Поверхности картонной коробки пронумерованы, как показано на фиг. 2. Сложенные лотки упаковывают в картонную коробку таким образом, чтобы кончик иглы предварительно наполненного шприца был обращен к поверхности 2. Упакованный таким образом в картонную коробку образец сбрасывают с высоты 38,1 см поверхностью вниз, при падении меняют порядок: поверхность 1, поверхность 2, поверхность 3 и поверхность 4. При таком падении, определенном как одна серия падений, две серии падений выполняют за одно испытание на падение.

Испытание на вибрацию

Образец шприца помещают в лоток, лоток упаковывают в картонную коробку, и картонную коробку помещают таким образом, чтобы цилиндр шприца был направлен параллельно земле. К картонной коробке накладывают вибрационную нагрузку с интенсивностью, установленной на «Низкий уровень грузовика» – 40 мин, «Средний уровень грузовика» – 15 мин, «Высокий уровень грузовика» – 5 мин и уровень воздуха I – 120 мин.

Оценка 2 визуально обнаруживаемых частиц

Проверяют, присутствуют или нет визуально обнаруживаемые частицы в растворе, которым наполнен шприц, таким же образом, как и в оценке 1 визуально обнаруживаемых частиц примера 1, за исключением того, что яркость в положении непосредственно под источником белого света составляла около 6000 лк.

Способ идентификации визуально обнаруживаемых частиц

В каждом из всех образцов, в которых было обнаружено наличие визуально обнаруживаемых частиц в результате оценки 2 визуально обнаруживаемых частиц, проведенной после приложения механического напряжения, все количество раствора аспирационно фильтруют с помощью никелевого фильтра с размером пор 3 мкм. Получают спектр комбинационного рамановского рассеяния инородного вещества, имеющего наибольший размер среди частиц, захваченных фильтром, и идентификацией подтверждают, что частицы происходят от mAb2.

Результаты оценки

Результаты идентификации визуально обнаруживаемых частиц, полученных после приложения механического напряжения, показаны в табл. 6 ниже. Как показано ниже, даже когда содержится соответствующее количество поверхностно-активного вещества, визуально обнаруживаемые белковые частицы обнаружены во многих образцах, когда объем воздуха был обычным объемом воздуха 120 мкл. Было установлено, что при уменьшении объема воздуха до 69 мкл или менее визуально обнаруживаемые белковые частицы, которые нельзя ингибировать добавлением поверхностно-активного вещества, могут уменьшаться.

Гистограмма размеров визуально обнаруживаемых белковых частиц, идентифицированных таким образом, как показано на фиг. 4. Диапазон размеров визуально обнаруживаемых белковых частиц составляет от 46,0 до 279 мкм.

Таблица 6. Результаты идентификации визуально фиксируемых частиц после применения механического напряжения

Образец	Наполненное количество (мл)	Объем воздуха (мл)	Число образцов	Число образцов визуально фиксируемых белковых частиц
mAb2-01	1	120	10	4
mAb2-02		90	10	4
mAb2-03		69	10	1
mAb2-04		46	10	1
mAb2-05		23	10	1
mAb2-06		3	10	0

Пример 4. Исследование, подтверждающее образование видимых частиц mAb3

Раствор, содержащий mAb3 (mAb3: 120 мг/мл, буфер: 20 мМ/л гистидина, стабилизатор: 150 мМ/л аргинина и около 162 мМ/л аспарагиновой кислоты, поверхностно-активное вещество: 0,5 мг/мл полоксамера 188, рН 6,0), фильтруют через фильтр 0,22 мкм, затем 1,0 мл полученным раствором наполняют шприц СОР с иглой 27G (стандарт 1 мл), простерилизованный радиацией (25 кГр), и полученный шприц закрывают пробкой. Что касается наполненного и закупоренного образца, оценку 1 видимых частиц проводят сразу после закупоривания, а образец, в котором было установлено, что он содержит видимые частицы в шприце, исключают. На основании стандартной кривой, созданной в примере 1, положение пробки шприца отрегулировано так, чтобы оно соответствовало целевому объему воздуха, показанному в табл. 7. Каждый образец каждого объема воздуха хранят при температуре 40°C в течение примерно 60 дней после приложения механического напряжения в начале испытания, а затем оценку 2 видимых частиц проводят в тех же условиях, что и в оценке 1 видимых частиц настоящего примера.

Оценка 1 видимых частиц

Таким же образом, как и в оценке 1 визуально обнаруживаемых частиц из примера 1, шприц медленно вращают или переворачивают при яркости примерно от 3000 до 3750 лк перед черным фоном в течение 11 секунд или дольше и перед белым фоном в течение 5 сек или дольше, и наблюдают, чтобы проверить, присутствуют ли видимые частицы в растворе, которым наполнен шприц.

Таблица 7. Настройка условий по объему воздуха

Расстояние от края до пробки	Объем воздуха
11 мм	120 мкл
12,5 мм	76 мкл
13,7 мм	42 мкл
15,1 мм	3 мкл

Механическое напряжение

Согласно ASTM D4169, вибрационное напряжение применяют при следующих условиях. Затем вращательное напряжение применяют 200 раз при следующих условиях.

5 Испытание на вибрацию

Образец шприца помещают в трубку и трубку ставят так, чтобы цилиндр шприца был направлен вертикально к земле. К трубке накладывают вибрационную нагрузку с интенсивностью, установленной на «Низкий уровень грузовика» – 40 мин, «Средний уровень грузовика» – 15 мин, «Высокий уровень грузовика» – 5 мин и уровень воздуха II – 120 мин.

Вращательное напряжение

Образец шприца помещали в трубку таким образом, чтобы цилиндр шприца был направлен вертикально к земле. Полученный материал вручную вращают со скоростью, при которой воздух внутри шприца достаточно перемещался.

15 Результаты оценки

Результаты оценки 2 видимых частиц, полученных после хранения при 40°C в течение 60 дней, показаны в табл. 8 ниже. Так же, как и в табл. 6 примера 3, даже когда содержится соответствующее количество поверхностно-активного вещества, видимые частицы обнаруживают во множестве образцов, имеющих объем воздуха 120 мкл. Было обнаружено, что при уменьшении объема воздуха до 42 мкл или менее количество видимых частиц, которые нельзя ингибировать добавлением поверхностно-активного вещества, может быть уменьшено.

Таблица 8. Оценка результатов по визуально фиксируемым частицам после хранения при 40°C в течение 60 дней

Образец	Наполненный объем (мл)	Объем воздуха (мл)	Число визуально исследованных образцов	Число образцов, содержащих визуально фиксируемые частицы
mAb3-01	1	120	20	3
mAb3-02		76	20	3
mAb3-03		42	20	1
mAb3-04		3	20	0

Пример 5. Тест, подтверждающий образование визуально обнаруживаемых частиц mAb3

Раствор, содержащий mAb3 (mAb3: 120 мг/мл, буфер: 20 мМ/л гистидина, стабилизатор: 150 мМ/л аргинина и 162 мМ/л аспарагиновой кислоты, поверхностно-активное вещество: 0,5 мг/мл полоксамера 188, рН 6,0) фильтруют с помощью фильтра 0,22 мкм, затем полученным раствором в количестве 2,0 мл наполняют шприц СОР с иглой 27G (стандарт 2,25 мл), стерилизованный радиацией (25 кГр), и полученный шприц закрывают пробкой. Что касается наполненного и закупоренного образца, оценку 1 визуально обнаруживаемых частиц проводят сразу после закупоривания, а образец, в котором было установлено, что он содержит визуально обнаруживаемые частицы в шприце, исключают. На основе стандартной кривой, полученной с помощью приводимого ниже способа измерения/установки объема воздуха, положение поршня шприца регулируют так, чтобы оно соответствовало целевому объему воздуха, показанному в табл. 9. Каждый образец каждого объема воздуха хранят при температуре 25°C в течение примерно 3 месяцев, а затем проводят оценку 2 визуально обнаруживаемых частиц. Всего за время хранения механическое воздействие осуществляют трижды: в начале хранения, через 2 недели после начала хранения и через 3 недели после начала хранения.

Оценка 1 визуально обнаруживаемых частиц

Проверяли, присутствуют или нет визуально обнаруживаемые частицы в растворе, которым наполнен шприц, таким же образом, как и в оценке 1 визуально обнаруживаемых частиц примера 1, за исключением того, что яркость в положении непосредственно под источником белого света составляла около 8000 лк.

Способ измерения/установки объема воздуха

Шприцы СОР с иглой 27G (стандарт 2,25 мл) для каждого образца, содержащие 2,0 мл раствора определенного антитела и закупоренные пробкой, держат иглой вверх, из кончика иглы вытесняют воздух, поднимая его до основания иглы, и таким образом готовят образец, из которого максимально выпускают воздух. Расстояние от конца до пробки составляет 14,2 мм.

В образец, из которого максимально возможно был выпущен воздух, вводят 120 мкл воздуха, воткнув иглу другого шприца со стороны резиновой пробки образца. Расстояние от фланца до стопора составляет 12 мм.

5 На основе результатов этих измерений построена стандартная кривая расстояния от конца до пробки и объема воздуха, а объем воздуха установлен на основе расстояния от конца до пробки. Условия для установленного таким образом объема воздуха показаны в табл. 9 ниже.

Таблица 9. Настройка условий по объему воздуха

Расстояние от края до пробки	Объем воздуха
12 мм	120 мкл
14,02 мм	10 мкл
14,2 мм	3 мкл

10 Механическое напряжение

Что касается ASTM D4169, то следующие испытания на падение и на вибрацию были объединены в следующем порядке: испытание на падение, испытание на вибрацию и испытание на падение при приложении нагрузки в начале хранения. Нагрузку только в форме испытания на падение применяют 15 путем повторения 2 серий испытания на падение в двух испытаниях на падение, проводимых через 2 недели после начала хранения и через 3 недели после начала хранения. Испытание на падение и испытание на вибрацию проводят таким же образом, как в примере 3.

Оценка 2 визуально обнаруживаемых частиц

20 Проверяли, присутствуют или нет визуально обнаруживаемые частицы в растворе, которым наполнен шприц, таким же образом, как и в оценке 1 визуально обнаруживаемых частиц примера 1, за исключением того, что яркость в положении непосредственно под источником белого света составляет около 8000 лк.

25 Результаты оценки

Результаты оценки визуально обнаруживаемых частиц, полученных после хранения при температуре 25°C в течение примерно 3 месяцев, показаны в табл. 8 ниже. Так же, как и в табл. 6 из примера 3, даже когда содержится соответствующее количество поверхностно-активного вещества, обнаружено,

что визуально обнаруживаемые частицы присутствуют во множестве образцов, имеющих объем воздуха 120 мкл.

5 Обнаружено, что при уменьшении объема воздуха до 10 мкл или менее количество визуально обнаруживаемых частиц, которые нельзя ингибировать добавлением поверхностно-активного вещества, может быть уменьшено.

Таблица 10. Оценка результатов по визуально фиксируемым частицам после хранения при 25°C в течение 3 месяцев

Образец	Наполненное количество (мл)	Объем воздуха (мл)	Число визуально исследованных образцов	Число образцов, содержащих визуально фиксируемые частицы
mAb3-01	2	120	10	10
mAb3-02		10	10	3
mAb3-03		3	10	1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок, белка с высоким риском образования в растворе частиц, включающий:

построение модели трехмерной структуры белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антитела;

определение участков на поверхности полученной модели, соответствующих кластеру гидрофобных остатков и соответствующих кластеру остатков с зарядом в виде гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, соответственно, а также расчет площадей пэтчей;

расчет суммы площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных по площади (X ((ангстрем)²)), и общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и

определение того, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 1700 или более, является белком с высоким риском образования частиц в растворе, причем размер частиц, составляет 40 мкм или более.

2. Способ по п. 1, в котором белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 2000 или более, определяют как белок, имеющий высокий риск образования частиц в растворе.

3. Способ определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок, белка с высоким риском образования в растворе частиц, включающий:

построение модели трехмерной структуры белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антитела;

определение участка на поверхности полученной модели, соответствующего кластеру остатков с зарядом в виде заряженного пэтча, и расчет общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и

определение того, что белок, имеющий значение Υ 600 или более, является белком с высоким риском образования частиц в растворе, причем размер частиц, составляет 40 мкм или более.

5 4. Способ по любому из п.п. 1-3, в котором раствор является водным раствором.

5. Способ по любому из п.п. 1-4, в котором белок является моноклональным антителом.

10

6. Способ по п. 5, в котором моноклональное антитело является моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

15 7. Способ по любому из п.п. 1-6, в котором моделирование гомологии или моделирование антитела осуществляют с использованием программного обеспечения Молекулярной Операционной Среды (МОС).

20 8. Способ уменьшения в составе для инъекций, в котором содержится в растворе белок в качестве активного ингредиента и которым наполняют контейнер, формирования в растворе частиц; указанный способ включает:
уменьшение объема пузырьков воздуха в контейнере до 40 мкл или менее, причем контейнер является шприцом или картриджем, и белок является белком, который определен способом по любому из п.п. 1-7, как имеющий высокий риск образования частиц в растворе.

25

9. Способ по п. 8, включающий уменьшение объема пузырьков воздуха в контейнере до 10 мкл или менее.

30 10. Способ получения состава для инъекций, в котором раствором, включающим белок в качестве активного ингредиента, наполняют контейнер; указанный способ включает:

наполнение раствором контейнера таким образом, чтобы объем пузырьков воздуха в контейнере, составляет 40 мкл или менее в полученном составе для инъекции, причем контейнер представляет собой шприц или картридж, и

5 белок является белком, который определен способом по любому из п.п. 1-7, как имеющий высокий риск образования частиц в растворе.

11. Способ по п. 9, включающий наполнение раствором контейнера таким образом, чтобы объем пузырьков воздуха в контейнере составлял 10 мкл или менее в получаемом составе для инъекции.

10

12. Способ по п.п. 10 или 11, в котором раствор является водным раствором.

13. Состав для инъекций, в котором раствором, содержащим белок в качестве активного ингредиента, наполняют контейнер,

15

причем белок является белком, который определен способом по любому из п.п. 1-6, как имеющий высокий риск образования частиц в растворе, контейнер представляет собой шприц или картридж, и объем пузырьков воздуха в контейнере составляет 40 мкл или менее.

20

14. Состав для инъекций по п. 13, в котором объем пузырьков воздуха в контейнере составляет 10 мкл или менее.

15. Состав для инъекций по п.п. 13 или 14, в котором раствор является водным раствором.

25

16. Система определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок, белка с высоким риском образования в растворе частиц, включающая:

30

средства для построения трехмерной структурной модели белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антитела;

средства для определения участка на поверхности полученной модели, где гидрофобные остатки накапливаются в кластере, и части, где остатки с зарядом накапливаются в кластере, в виде гидрофобного пэтча и заряженного пэтча, соответственно, а также расчет площадей пэтчей;

5 средства для расчета суммы площадей 5 наиболее выраженных гидрофобных пэтчей, ранжированных по площади (X ((ангстрем)²)), и общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²)); и

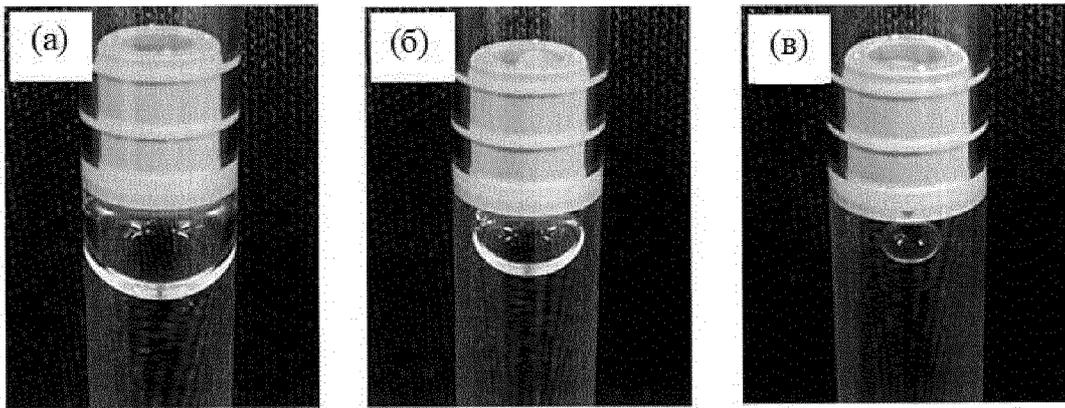
10 средства для определения того, что белок, имеющий значение « $X + Y \times 1,5$ » 1700 или более, является белком с высоким риском образования частиц в растворе, причем размер частиц, составляет 40 мкм или более.

15 17. Система определения в фармацевтическом составе, содержащем в растворе в качестве активного ингредиента белок, белка с высоким риском образования в растворе частиц, включающая:

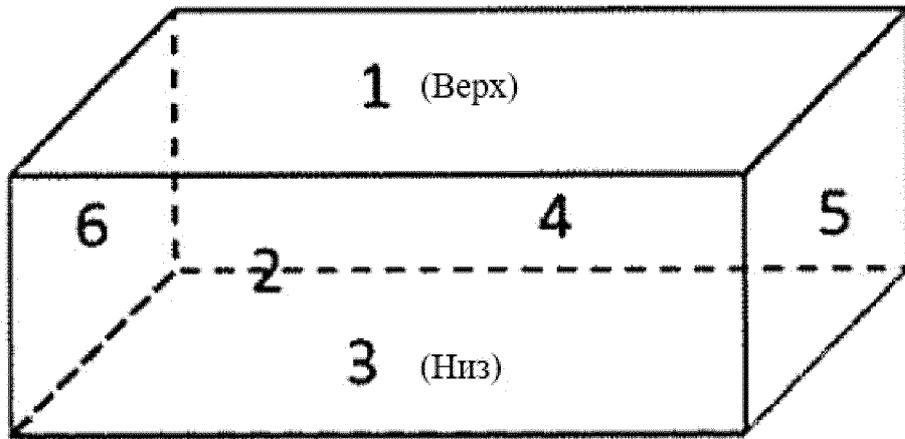
средства для построения трехмерной структурной модели белка на основе аминокислотной последовательности белка путем моделирования гомологии или моделирования антитела;

20 средства для определения участка на поверхности полученной модели, соответствующего кластеру остатков с зарядом в виде заряженного пэтча, и расчет общей площади заряженных пэтчей (Y ((ангстрем)²));

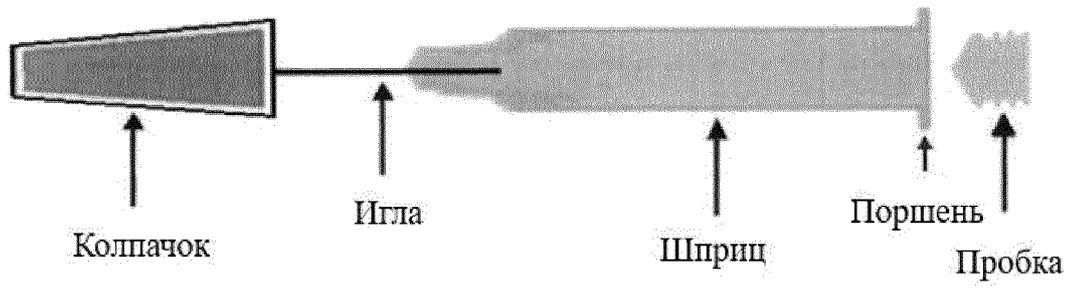
25 средства для определения того, что белок, имеющий значение Y 600 или более, является белком с высоким риском образования частиц в растворе, причем размер частиц, составляет 40 мкм или более.



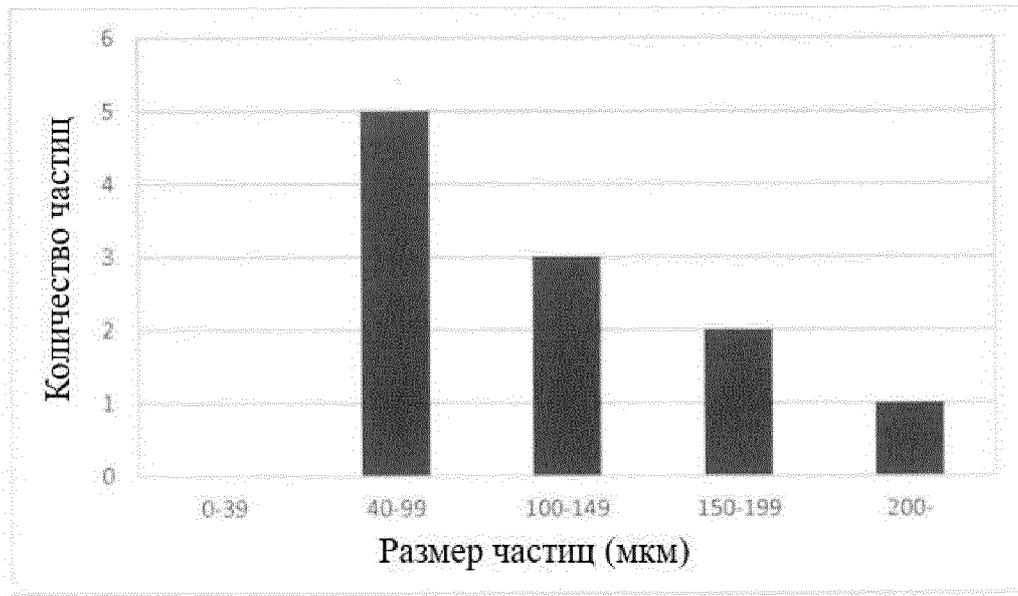
Фигура 1



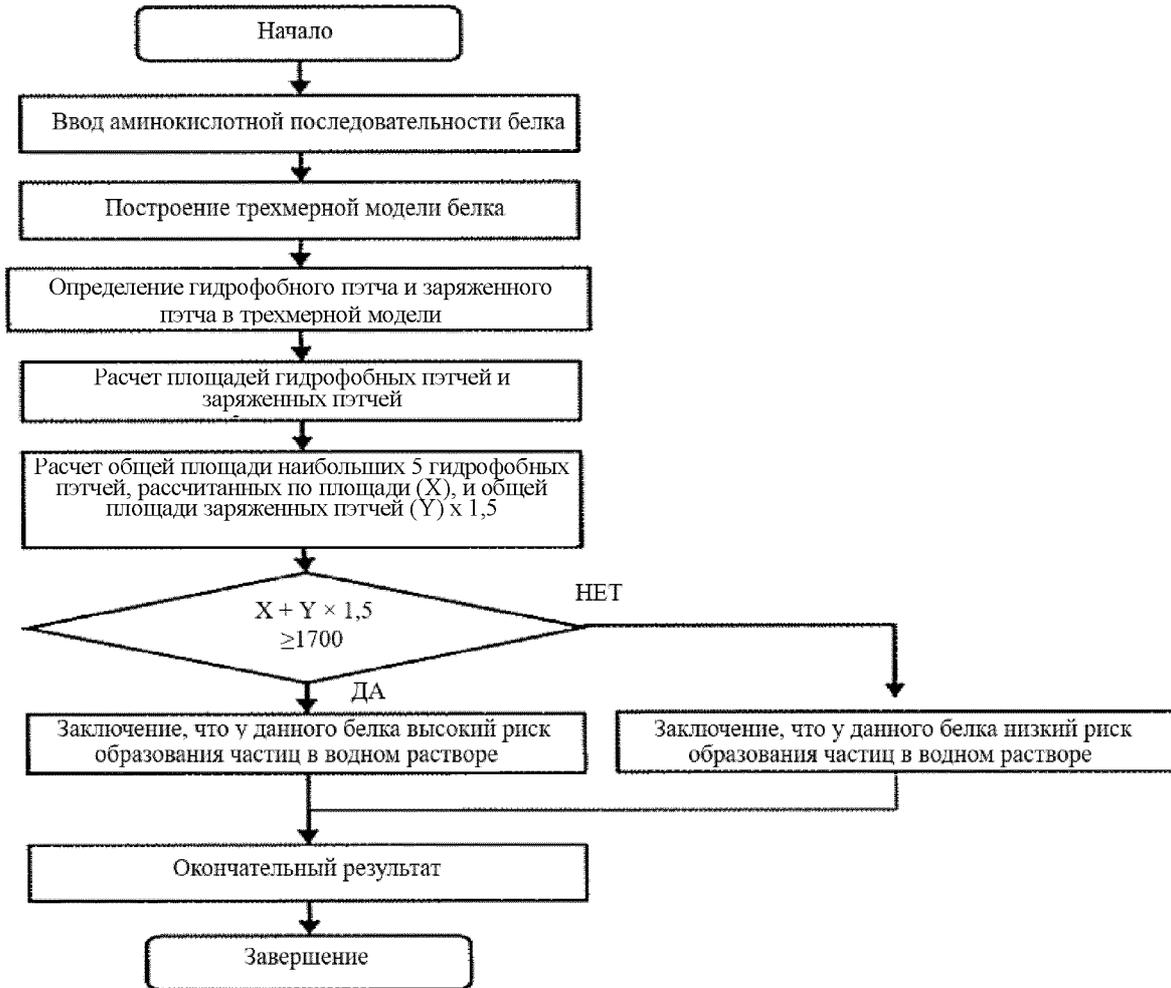
Фигура 2



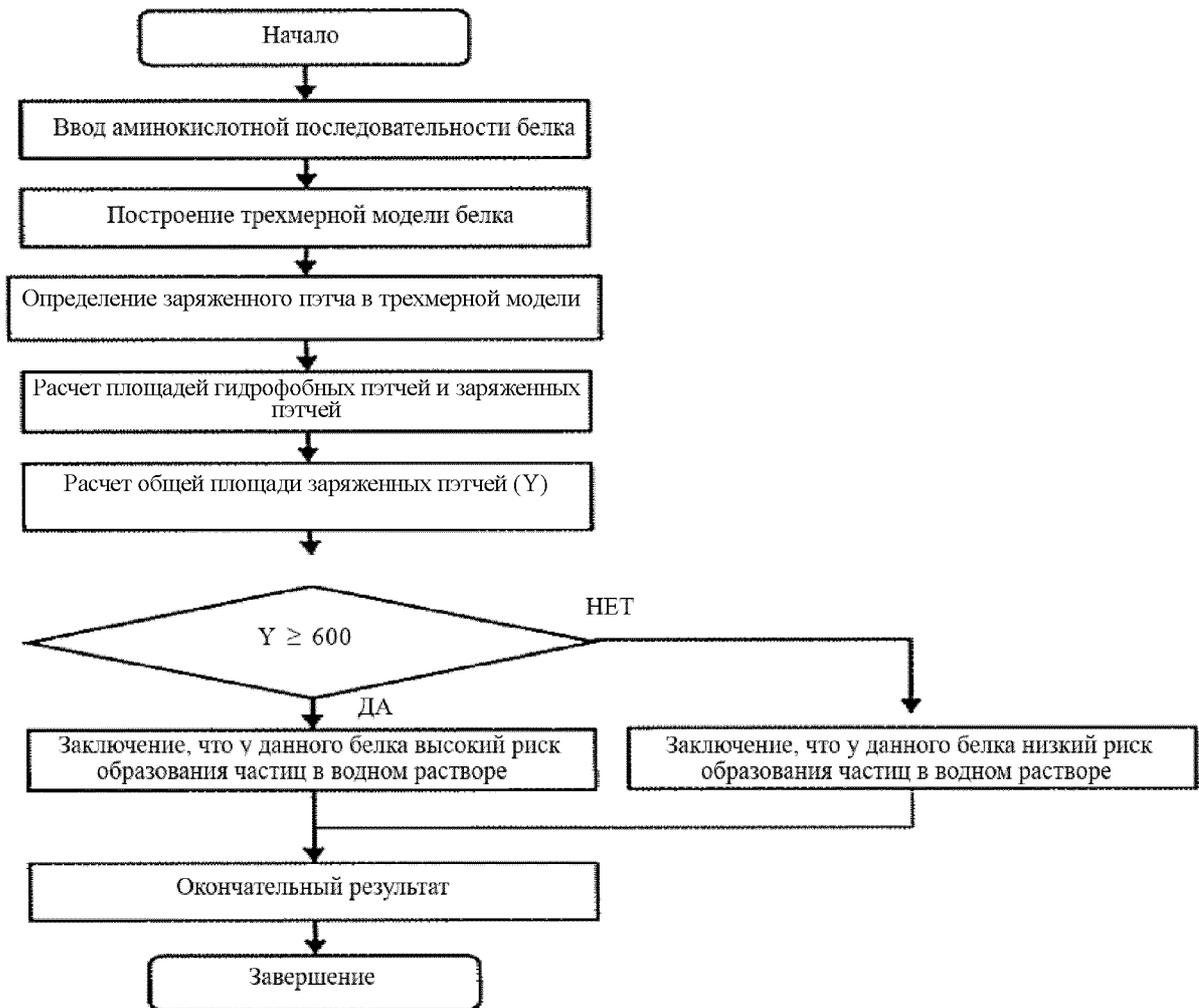
Фигура 3



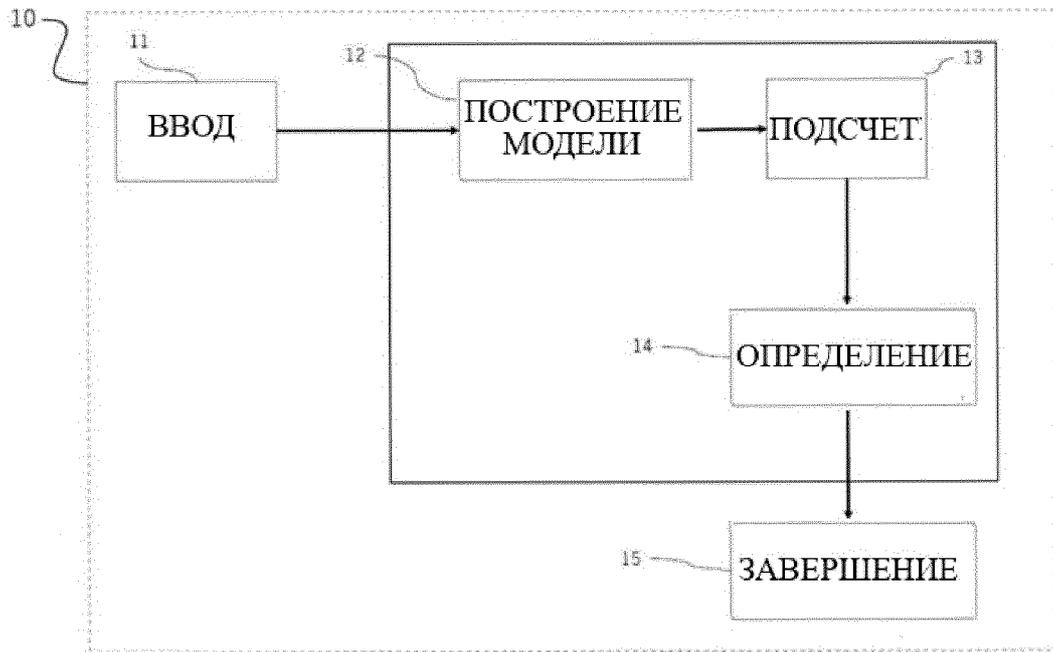
Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7